

**O.R.S.T.O.M.**  
**Institut Français de Recherche Scientifique**  
**pour le Développement en Coopération**

**CENTRE DE NOUMÉA**

**LA FUSARIOSE DU MAÏS**  
**ET LES MYCOTOXINES FUSARIENNES**  
**EN NOUVELLE-CALÉDONIE**

**RAPPORT SEMESTRIEL Juillet - Décembre 1986**

**CONTRAT DE RECHERCHE C.E.E./ORSTOM**

**N° TSD - A - 244 - F -(3)**

**SERVICE DE PHYTOPATHOLOGIE**

**Centre ORSTOM-BP A5-NOUMÉA**  
**NOUVELLE-CALÉDONIE**



LA FUSARIOSE DU MAIS  
EN NOUVELLE - CALEDONIE

--oOo--

RAPPORT SEMESTRIEL SUR LES RECHERCHES EFFECTUEES DE  
JUILLET A DECEMBRE 1986

- F. PELLEGRIN, F. KOHLER, C. LAMBERT, J. KONGOULEUX,  
B. BOCCAS.  
Laboratoire de Phytopathologie du Centre ORSTOM de Nouméa.
- D. LAURENT  
Laboratoire de Chimie des Substances Naturelles du Centre  
ORSTOM de Nouméa.
- D. DESOUTTER  
Laboratoire Vétérinaire Territorial.
- L. COLLET  
Centre de Recherche et d'Expérimentation Agronomiques

## S O M M A I R E

<b>INTRODUCTION</b>	1
<b>PHYTOPATHOLOGIE</b>	3
<b>A- Agronomie</b>	
<b>B- Physiologie de l'infection</b>	6
I) Choix du précurseur	
1- Mesure de croissance	
2- Mesure de l'absorption	
II) Marquage de <u>Fusarium</u> par la Thymines radioactive	
1- Techniques de mesure	
a) Scintillateur	
b) Historadiographie	
2- Mise en oeuvre du marquage radioactif	
a) Mesure de l'absorption de la Thymines	
b) Historadiographie	
<b>CHIMIE - TOXICOLOGIE</b>	20
<b>A- Préparation et administration des substrats</b>	
I) Récapitulatif	
II) Chimie	
<b>B- Toxicité sur canetons</b>	27
I) Préparation des aliments	
II) Expérimentation animale	
III) Résultats et discussion	
<b>C- Toxicité sur rats</b>	32
I) Toxicité générale	
1- Voies d'administration	
2- Milieux de culture	
3- Extraits de culture	
4- Les souches fusariennes	
II) Expérimentations par voies orales	
1- Résultats nécropsiques	
a) Les organes lésés	
b) Relation effet-dose	
2- Résultats histologiques	
a) Confirmation des lésions macroscopiques	
b) Découvertes histologiques	
III) Expérimentations par voie péritonéale	
<b>D- Test d'inhibition de croissance sur cellules VERO</b>	53
<b>PROTOCOLE</b>	
I) Préparation des milieux et solutions	
II) Préparation des solutions d'extraits	
III) Cultures de cellules VERO	
IV) Réalisation du test	

<b>RESULTATS</b>	64
1- Résultats des 4 premières séries	
2- Résultat des séries 5 à 8	
3- Résultat des séries 9 à 10	
<b>E- Reproduction expérimentale de la Leucoencéphalomalacie équine</b>	73
<b>PROTOCOLE</b>	
I) Provenance de l'animal	
II) Réception et préparation de l'animal	
III) Mise en expérimentation	
IV) Fin de l'expérimentation	
<b>COMPTE-RENDU CLINIQUE</b>	77
I) Examen physique	
II) Contrôle de la consommation alimentaire	
III) Biochimie-cytologie urinaire	
IV) Biochimie sanguine	
V) Hématologie	
VI) Synthèse clinique	
<b>COMPTE-RENDU D'AUTOPSIE</b>	85
<b>COMPTE-RENDU D'HISTOLOGIE</b>	89
<b>CONCLUSION</b>	95
<b>BIBLIOGRAPHIE</b>	96

## INTRODUCTION

Les comptes-rendus du premier et second semestre donnaient les motivations de ce programme et le situait par rapport aux connaissances actuelles sur le sujet. Nous ne jugeons pas utile de nous répéter.

Dans le présent compte-rendu, nous nous attacherons à faire le point sur l'état d'avancement des recherches sur le plan phytopathologique, chimique et toxicologique fin 1986 en liaison avec les résultats exposés dans les précédents rapports.

Rappelons brièvement les principaux thèmes que nous avons convenu d'approfondir.

### Sur le plan phytopathologique

Agronomie : dans la perspective d'un contrôle de la fusariose du maïs et avec la collaboration des Services de l'Agriculture du Territoire, nous avons continué le suivi des essais variétaux et mis en place plusieurs essais plus spécifiques afin de vérifier la résistance de quelques variétés sélectionnées pour avoir présenté une bonne résistance lors d'essais précédents.

Physiologie de l'infection : L'étude de l'infection au cours du cycle cultural du maïs, tant au champs qu'en serre, nous avait amenés à formuler plusieurs hypothèses.

- L'infection ne serait pas véritablement systémique et résulterait d'infections conidiennes multiples à l'aisselle des feuilles au point d'insertion sur la tige.

- L'infection serait généralisée mais latente au niveau des ébauches des noeuds déjà formés dès la 4ème ou 5ème semaine. Les tissus nodaux se séparant rapidement lors de la phase d'élongation qui suit la formation des ébauches florales, le Fusarium passerait alors progressivement de l'état latent à une croissance active.

- L'infection serait d'un modèle systémique classique caractérisé par une invasion progressive et ascendante des tissus de la tige.

Dans le but de vérifier ces hypothèses et afin de caractériser la présence de F.moniliforme dans les tissus du maïs, nous poursuivons actuellement une expérimentation où l'utilisation de marqueurs permettra de visualiser le parasite dans son hôte et de suivre sa progression.

## Sur le plan chimique et toxicologique

Différentes méthodes d'administration de substrats contaminés par F.moniliforme nous ont permis de classer les souches isolées en Nouvelle-Calédonie par ordre de toxicité croissante.

Nous nous sommes alors consacrés à l'étude des souches les plus toxiques pour tenter de donner une réponse aux principales interrogations.

- Pourquoi l'épreuve biologique coinsidérée comme la mieux adaptée par l'équipe sud-africaine, à savoir l'administration per os à des canetons Pékin, ne produit pas, dans nos essais, les résultats escomptés ?

- L'histopathologie de la toxicité sur rat est-elle identique à celle décrite par d'autres équipes ?

- La toxicité observée sur rats est-elle liée à la L.E.M. ?

- Est-il possible d'extraire puis de purifier le (ou les) principe(s) toxique(s) des substrats fusariens afin de développer les études chimiques d'identification de la (ou des) toxine (s) ?

=====

## PHYTOPATHOLOGIE

### A - Agronomie :

L'essai intervariétal du CREA (Centre de Recherche et d'Expérimentation Agronomiques) de saison chaude avait permis d'identifier trois hybrides indemnes de fusariose systémique alors que toutes les autres variétés révélaient leurs sensibilité à la maladie en donnant des épis fortement contaminés. Ces trois variétés (Limagrain HE 1049 et HE 1066 ainsi que IITA 8321-18) pouvaient manifester ainsi une résistance génétique à la maladie, il convenait donc de les remettre en expérimentation pendant le cycle de saison fraîche en conditions naturelles et en conditions artificielles sous une pression d'inoculum drastique.

Conditions naturelles : Les 3 variétés ont été intégrées : à un essai intervariétal à raison d'une parcelle par variété et parallèlement à des essais, d'amendements calciques à raison de 6 parcelles par variétés.

Conditions artificielles : Cet essai a été mené en ombrière à raison 25 plants par variété. Chaque plant, issu d'une graine prégermée a été disposé en pot de 20 kgs contenant de la terre tamisée additionnée des engrais suivants :

- 17,5 g de Nitrate d'ammonium.
- 8,6 g de Phosphate de Potassium.
- 2,8 g de Sulfate de Potassium.

oligo éléments : Acide Borique : 10 ml d'une solution mère de 5 g 5 litres

" " 7,825 g 5l Sulfate de cuivre : 10 ml " "

" " 0,4 g 5l Molybdate d'ammonium : 10 ml " "

" " 5,998 5l. Sulfate de Zinc = 10 ml " "

A la plantation, un broyat mycélien de la souche 68 a été inoculé à chaque plant à raison de 10 ml par pot.

Le Tableau I donne les résultats des isollements.

Quatre prélèvements du rachis ont été effectués sur chaque épis mur fragmenté en 3 morceaux. Pour l'essai en ombrière, 5 plants ont été prélevés à la 18ème semaine et des isollements effectués au niveau des noeuds 1, 5 et 9.

Comme on peut le constater dans le tableau 1, les 3 variétés qui présentaient une bonne résistance lors du cycle de saison chaude, n'ont pas montré les mêmes dispositions en conditions naturelles pour le cycle

TABLEAU I

## TAUX DE CONTAMINATION DES VAR "RESISTANTES"

VARIETES	ESSAI OMBRIERE		ESSAI TAMOA 6 PARCELLES	ESSAI VARIETAL BOURAIL
	<u>épis fusariens</u> épis examinés	<u>plants fusariens</u> plants examinés	<u>épis fusariens</u> épis examinés	<u>épis fusariens</u> épis examinés
LIMAGRAIN HE - 1049	1/20	3/5 au noeud 5) 2/5 au noeud 9) 5/5	27/30	3/5
LIMAGRAIN HE - 1066	1/20	1/5 au noeud 1) 3/5 au noeud 5) 1/5 au noeud 9) 5/5	16/30	4/5
I.I.T.A.	3/20	1/5 au noeud 5) 4/5 au noeud 9) 5/5	30/30	3/5



TABLEAU II

ESSAI INTERVARIETAL - C.R.E.A. - BOURAIL

HYBRIDE OU VARIETE	EPIS INFECTES	EPIS EXAMINES	HYBRIDE OU VARIETE	EPIS INFECTES	EPIS EXAMINES
TEMOIN : XL 82	24	36	I AO 23	4	5
HE 1049	3	5	IRAT 81	4	5
HE 1066	4	5	IRAT 83	4	5
HE 6132	2	5	IRAT 178	2	4
HE 1047	5	5	IRAT 179	5	5
HE 1011	2	5	8239-15	3	5
CTM 8	4	5	8322-13	2	5
PAC 030	1	1	8341-06	2	5
E 188	5	5	8326-17	5	5
CTM 19	3	5	8321-18	3	5
FBH 1	4	5	8329-23	5	5
PFA 21	4	5	CTM-18	4	5
PFA 22	4	5	FBH-04	3	5
PFA 23	5	5	E 607	4	5
PFA 24	1	5	HYCORN 09	1	3
PFA 25	3	5	XL 81	4	5
G 491	0	5	GENERAL	1	5
G 493	2	5	DENT DE CHEVAL	4	4
G 4733	4	5	3183	2	5
CG 4141	5	5	GH 5006	5	5
CG 4502	2	5	CTM 20	4	5
GUAYMAS 8022	5	5	6875	2	5
ACROSS 8043	4	5	3165	5	5
SUWAN 8131	5	5	IRAT REUNION	1	5
ILONGA 8032	0	4	XL 94	4	5
SERGEANT	5	5	GH 5004	4	5
X 304 C	5	5	PAC 009	4	5
IAO 25	3	5			

de saison fraîche. En conditions artificielles, une certaine résistance semble se manifester. En effet, malgré un apport massif d'inoculum à la plantation, la progression du parasite dans les plantes semble "retardée".

Les essais en serre ont montré précédemment qu'à la 17ème - 18ème semaine, l'invasion atteint le 13ème noeud. Dans cet essai, parmi les 3 variétés, infestées à 100 % - notons le -, la variété IITA 8321 - 18 est colonisée au moins jusqu'au 9ème noeud, c'est-à-dire au delà du point d'attache de l'épis, les variétés Limagrain ne sont par contre colonisées en moyenne que jusqu'au noeud 5. En outre, le taux de contamination des épis est très faible pour les 3 variétés. Ces faits semblent démontrer la présence d'une certaine résistance générale, insuffisante en ce qui concerne un cycle long de saison fraîche en conditions naturelles (5,5 mois) mais qui se manifeste lors des cycles courts de saison chaudes (3,5 mois) ou, en ombrière où les conditions optimales de culture favorisent une croissance et une maturité rapide (4 mois).

Parallèlement aux essais portant sur les trois hybrides précédents, nous avons effectué une enquête sur un essai intervariétal en saison fraîche, les résultats sont résumés dans le tableau II.

Deux variétés : G 491 et ILONGA 8032 ont donné des résultats négatifs pour ce cycle de longue durée (5,5 mois), elles seront intégrées au prochain essai intervariétal de saison chaude pour confirmation.

## **B - Physiologie de l'infection :**

Dans le but d'identifier la façon dont F. moniliforme colonise les plants de maïs au cours du cycle végétatif, nous avons entrepris des expérimentations où l'utilisation de marqueurs devrait nous permettre de visualiser le parasite dans son hôte et de suivre sa progression.

Une première tentative de marquage à l'aide d'un marqueur fluorescent s'étant soldée par un échec, nous avons choisi de faire appel à un marqueur radioactif.

### **I - Choix du précurseur**

Un précurseur spécifique a été retenu : la Thymine. Cette base pyrimidique ne se trouve que dans le DNA ce qui devrait éviter les diffusions intempestives par l'intermédiaire des RNA ribosomiques, de transferts ou messagers.

Des études préliminaires ont été effectuées pour vérifier dans quelles conditions et à quelles doses la Thymine est absorbée par le Fusarium en cours de croissance.

1) Mesure de croissance de deux souches de F. moniliforme toxiques sur milieu minéral gélosé complémenté avec de la Thymine.

Cette première expérimentation était destinée à vérifier si, par la vitesse de croissance des souches 68 R et 110, il était possible de mesurer l'absorption de la Thymine.

Le milieu minéral mis au point par Armstrong pour la culture des Fusarium a été utilisé :

- Saccharose.....	10	g
- Mg SO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O.....	0,4	g
- KCl.....	1,6	g
- KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .....	1,1	g
- Ca (NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> .....	5,9	g
- Fe Cl <sub>2</sub> .....	0,2	ppm
- Mn SO <sub>4</sub> .....	0,2	ppm
- Zn SO <sub>4</sub> .....	0,2	ppm
- Agar - Agar.....	20	g
- H <sub>2</sub> O.....	1	litre.

Les figures I et II montrent qu'il y a pas de différence de vitesse de croissance des souches dans les milieux complétés à 4.10<sup>-3</sup>, 4.10<sup>-4</sup> et 4.10<sup>-5</sup> M. par de la Thymine pure. Nous avons donc cherché un autre moyen pour vérifier l'absorption de ce précurseur.

2) Mesure de l'absorption de la Thymine en milieu liquide : Le maximum de densité optique de la Thymine se situe à 265mp à pH 7. Le milieu de Armstrong n'est pas utilisable à ce pH car les Ca<sup>+</sup> précipitent. Nous avons donc utilisé le milieu minéral mis au point par Park pour l'isolement de F. oxysporum.

- Glucose.....	20	g
- Mg SO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O.....	1	g
- KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .....	0,4	g
- NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub> .....	0,2	g
- H <sub>2</sub> O.....	1	litre

pH= 5,5 ramené à 6,9 par l'ammoniaque, après stérilisation, le PH = 7

Trois concentrations de milieu ont été testées.

- Milieu A = milieu minéral complet.
- Milieu B = milieu A dilué au 1 2.
- Milieu C = milieu A dilué au 1 4.

Pour huit concentrations de Thymine par série de milieu : 0,315 ; 0,63 ; 0,945 ; 1,26 ; 1,575 ; 1,89 ; 2,205 ; 2,52 ; 10<sup>-4</sup> g.

La souche 68 R a été inoculée par implants calibrés dans des erlens contenant 25 ml de milieux de culture.

Après 12 jours d'incubation à 25°C avec alternance 12 h de lumière 12 h d'obscurité; les mesures ont été effectuées de la façon suivante.

# CROISSANCE FUSARIUM SUR MILIEU MINERAL

## COMPLEMENTE AVEC DE LA THYMINE

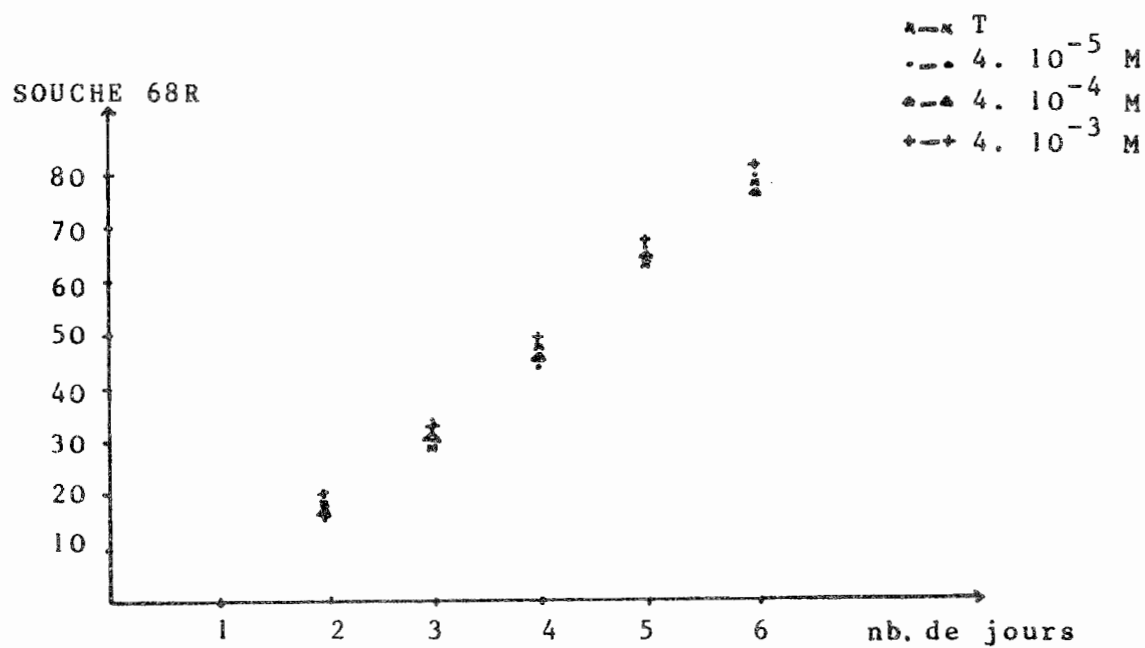


FIGURE I

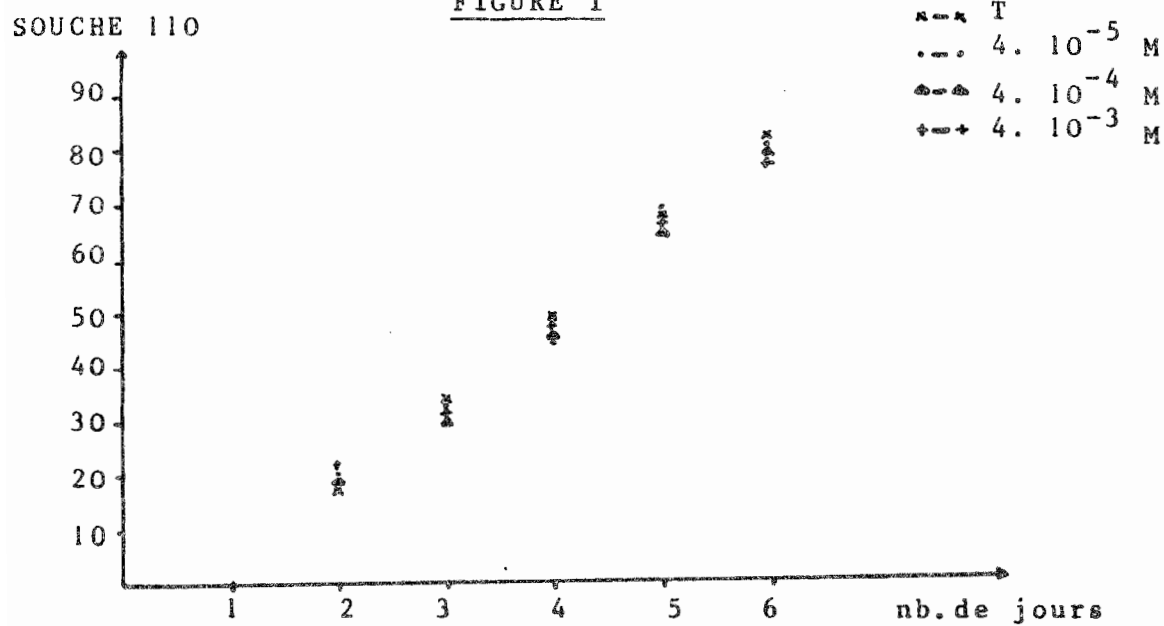


FIGURE II

Une série de chaque milieu non inoculé contenant les huit concentrations de Thymine servait de Blanc.

Une série de 3 erlens par milieu non complétement en Thymine a permis de mesurer le taux moyen d'excrétion protéique des souches après 12 jours de culture.

Une série de 2 erlens par milieu contenant les huit concentrations de Thymine a permis, après différence avec le taux moyen d'excrétion protéique, de mesurer la quantité restante de Thymine dans le milieu après 12 jours de culture.

Les figures III, VI, et V donnent les courbes d'absorption des cultures complémentées par rapport à l'absorption des mêmes concentrations de Thymine dans le milieu correspondant.

On constate que la Thymine est bien absorbée et que la meilleure absorption est obtenue dans le milieu C, c'est-à-dire, le milieu d'origine dilué au 1/4. Toutefois, la croissance du Fusarium dans ce milieu très appauvri est diffuse et très lente, nous avons donc décidé pour la poursuite de nos expérimentations d'utiliser le milieu B où l'absorption est encore bonne et où la croissance mycélienne est peu différente que dans le milieu A.

## II - Marquage de Fusarium par la Thymine radioactive

Ayant vérifié que la Thymine est bien absorbée par Fusarium au cours de sa croissance dans un milieu minéral approprié, il nous fallait définir quel genre d'isotope et d'activité spécifique étaient compatibles avec : les différentes techniques de mesures de radioactivité disponibles, les équipements de sécurité du laboratoire et l'objectif recherché, à savoir: l'identification et le suivi du parasite dans son hôte.

### 1) Techniques de mesures

Nous disposons sur place de deux équipements :

- Un scintillateur ;
- Un laboratoire photo susceptible de traiter les émulsions photosensibles historadiographiques.

a) Scintillateur : l'appareil est un Packard TRI - CARB 300 C permettant l'avancement et le comptage automatique des échantillons selon un programme défini par l'utilisateur. Nous avons programmé les grandes fonctions de la façon suivante :

- Temps de comptage..... 1 minute ;
- Nombre de répétitions..... 3
- Définition de la région basse énergie: fonction du radionucléotide
- Définition de la région haute énergie: " "

COMPARAISON DE L'ABSORPTION DE LA THYMINE  
EN FONCTION DE LA CONCENTRATION DU MILIEU MINERAL MINIMUM

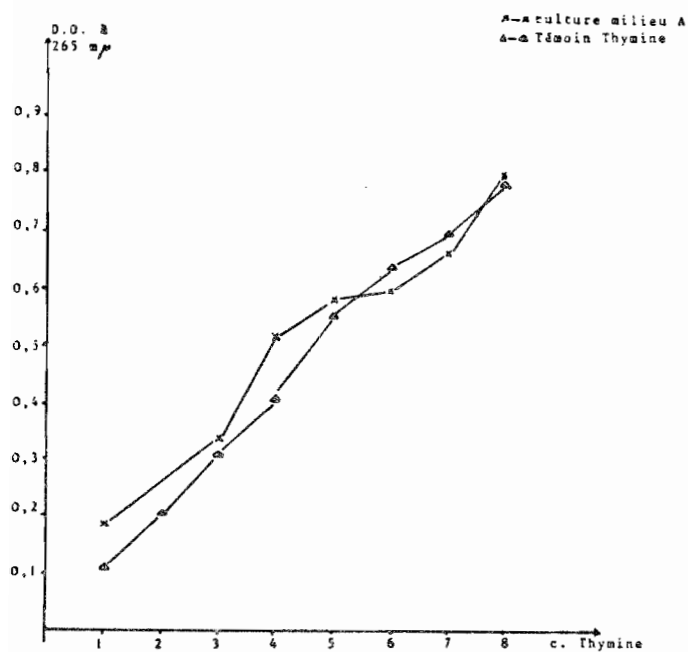


FIGURE III

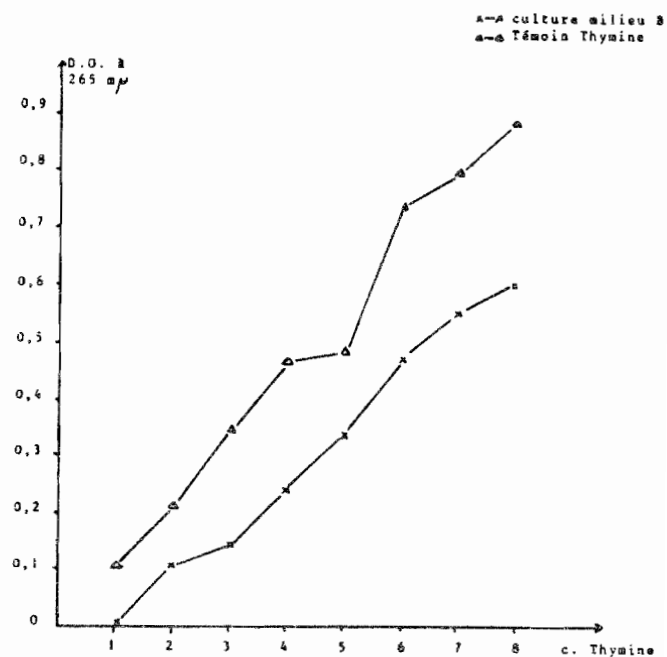


FIGURE IV

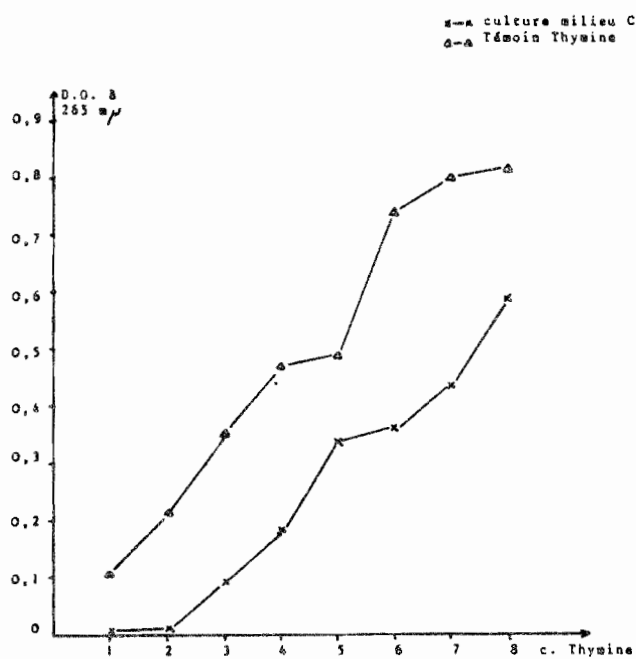


FIGURE V

- Précision de la mesure.....:

1

CPMA = Coups par minute dans la  $\sqrt{\text{nombre de coups}}$  région de basse énergie ;

CPMA totaux = Coups par minute de l'aliquote rapportés au volume total de l'échantillon.

CPMB = Coups par minute dans la région de haute énergie ;

CPMB totaux = Coups par minute de l'aliquote rapportés au volume total de l'échantillon.

Rapport du canal haute énergie canal basse énergie :  
Plus la valeur de ce rapport est voisine de 1, moins le bruit de fond perturbe le résultat.

b) Historiographie : Le laboratoire photo nous permet d'effectuer de l'historiographie selon la technique suivante :

- Incorporation du précurseur radioactif dans le végétal. En ce qui nous concerne, cette incorporation sera la conséquence de la colonisation du plant de maïs par F. moniliforme préalablement cultivé sur un milieu marqué.

- Prélèvement de la tige.

- Fixation F.A.A. (18p d'éthanol 70 % + 2 p de formol 40 % + 1 p d'ac. acétique) pendant 24 h.

- Lavage eau courante : 24 h.

- Deshydratation : 6 bains d'alcool pendant 20 minutes.

- Imprégnation : 3 bains de toluène pendant 15 minutes.

- Inclusion : 2 bains de paraffine 30 minutes à 1 heure.

- Coupes : 5 à 6 m.

- Pelliculage sur lame de microscope enduite d'eau gélatineuse.

- Déparaffinage.

- Séchage.

- Stripping avec film Kodak ARIO : Immerger les lames portant les coupes dans un bac contenant de l'eau tiède (25° C). Retourner le film dans l'eau pour qu'il s'étale. Ramener la lame de biais quand on la sort de l'eau pour que le film la couvre sans bulle d'air. Séchage dans une enceinte obscure contenant du Ca Cl2 pendant 12 h.

- Autoradiographie dans le noir, au froid (5° C) pendant 1 semaine à 3 mois.

- Développement photographique : - Révélation

- Rinçage à l'eau

- Fixation

- Lavage

- Coloration (bleu de toluidine 0,5 % pendant 1 minute).
- Rinçage à l'alcool 70.
- Deshydratation.
- Montage à l'Euparal.
- Observation au microscope.

## 2) Mise en oeuvre du marquage radioactif

L'objectif de cette expérimentation étant de détecter la présence de F. moniliforme dans la plante, puis de suivre sa progression au fur et à mesure de la croissance de celle-ci; nous avons plus à faire à une analyse qualitative qu'à une analyse quantitative.

Toutefois, afin de définir les doses du précurseur à utiliser, il était nécessaire de mesurer précisément la quantité d'isotope absorbée par F.moniliforme au cours de sa croissance.

### a) Mesure de l'absorption de la Thymine radioactive :

Les études préliminaires nous ont permis de mettre en évidence que dans un milieu minéral minimum appauvri F. moniliforme absorbe une partie de la Thymine non radioactive ajoutée au milieu. Les mesures par densité optiques dans la gamme des UV à 265  $\mu$ m se heurtant à l'interférence des substances protéiques excrétées par le champignon, il était exclu de pouvoir procéder à des dosages précis.

Le catalogue du fournisseur de radioéléments artificiels (CEA) nous laissait le choix entre le 3H ou le 14C comme radioisotopes stables servant à marquer la Thymine. Dans un premier temps nous avons choisi le 3H car c'est un isotope de basse énergie qui donne une haute activité spécifique aux molécules marquées. En outre, les quantités économiquement utilisables se rapprochaient sensiblement des doses utilisées pour les études préliminaires d'absorption de Thymine non radioactive. Malheureusement, le fournisseur a cessé tout récemment la production de cette molécule. Nous nous sommes alors rabattus sur le 14C comme isotope de marquage mais les doses économiquement supportables représentent des quantités de Thymine infimes (de l'ordre de 10<sup>-7</sup>M.), et il était nécessaire d'étudier à nouveau l'influence du milieu de culture sur la quantité de Thymine absorbée par le champignon lors de sa croissance.

a) Contrôle de l'absorption de 14C Thymine en fonction du milieu :

3 milieux ont été expérimentés :



- Milieu A : Glucose..... 10 g  
Mg SO<sub>4</sub> - 7 H<sub>2</sub>O..... 0,5 g  
KH<sub>2</sub> PO<sub>4</sub>..... 0,2 g  
NH<sub>4</sub> NO<sub>3</sub>..... 0,1 g  
H<sub>2</sub>O..... 1 litre

pH ajusté à 6,9 avec de l'ammoniaque.

- Milieu B : Saccharose..... 20 g  
Mg SO<sub>4</sub> 7H<sub>2</sub>O..... 0,4 g  
K Cl..... 1,6 g  
KH<sub>2</sub> PO<sub>4</sub>..... 1,1 g  
Ca (NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>..... 5,9 g  
FeCl<sub>2</sub>..... 0,2 ppm  
Mn SO<sub>4</sub>..... 0,2 ppm  
Zn SO<sub>4</sub>..... 0,2 ppm  
H<sub>2</sub>O..... 1 litre

pH ramené à 5,5 avec de l'ammoniaque pour éviter la précipitation du Ca

- Milieu C: Organique, à base d'extrait de pomme-de-terre (125 g de fécule de pomme-de-terre pour 1 litre d'eau) additionné de 20 g de glucose.

L'expérience a été réalisée sur 3 erlens contenant 25 ml de chaque milieu additionnés de 10  $\mu$ l d'une solution de <sup>14</sup>C Thymine marquée à 53,7 m Ci mM. La souche 68 R a été inoculée sous forme d'implants calibrés puis les erlens ont été enfermés dans un récipient hermétique (dessicateur) contenant une solution de Na OH 4N destinée à piéger le CO<sub>2</sub> dégagé dans l'éventualité où du <sup>14</sup>C provenant de la Thymine dégradée se serait échappé sous forme de <sup>14</sup>CO<sub>2</sub>. Les cultures ont été mises à incuber à 25° C avec alternance de 12 h jour 12 h d'obscurité et mises à l'air libre du dessicateur matin et soir pour combler la dépression due à l'absorption du CO<sub>2</sub>.

Un Erlen de chaque milieu ainsi que 3 aliquotes de 1 ml de solution de Na OH ont été prélevés le 3<sup>iem</sup>, 6<sup>iem</sup> et 13<sup>iem</sup> jour et ont subi les traitements suivants.

Les mycéliums en cours de croissance ont été séparés de leurs milieux par filtration et abondamment rincés à l'eau distillée. Les mattes mycéliennes ont été récupérées sur le filtre, pesées puis introduites dans les fioles à scintillation. Une aliquote de 1 ml de chaque milieu de culture ainsi que les 3 aliquotes de la solutions de Na OH ont également été distribuées dans des fioles à scintillation. Quinze ml de milieu scintillant (Aquasol II) ont été additionnés par fiole puis les échantillons ont été comptés au scintillateur.

Le tableau III récapitule les résultats obtenus sachant que l'échantillon A1 correspond au mycélium prélevé

# TABLEAU III

CONTROLE D'ABSORPTION DE  $^{14}$ C "THYMINE AU COURS DU TEMPS  
ET EN FONCTION DU MILIEU

(ECHAN- (TILLONS :	QUANTITE G ou ML :	AQUASOL II :	APPORT $^{14}$ C CPM :	C.P.M.A. :	C.P.M.A. totaux :	C.P.M.B. :	C.P.M.B. totaux :
A1 :	0,07 g :	15 cc :	1,18 107 :	21 332 :		19 921 :	
A2 :	1 ml :	" :	" :	376 601 :	9 415 025 :	360 296 :	9 007 400 :
A3 :	0,32 g :	" :	" :	1 142 300 :		1 082 880 :	
A4 :	1 ml :	" :	" :	253 724 :	6 343 100 :	242 592 :	6 064 800 :
A5 :	0,35 g :	" :	" :	3 507 939 :		3 248 141 :	
A6 :	1 ml :	" :	" :	94 619 :	2 365 475 :	90 535 :	2 263 375 :
B1 :	0,05 g :	" :	1,18 107 :	92 565 :		83 772 :	
B2 :	1 ml :	" :	" :	370 728 :	9 268 200 :	354 373 :	8 859 325 :
B3 :	0,5 g :	" :	" :	25 577 :		23 513 :	
B4 :	1 ml :	" :	" :	377 360 :	9 434 000 :	360 668 :	9 016 700 :
B5 :	1,2 g :	" :	" :	92 467 :		66 516 :	
B6 :	1 ml :	" :	" :	340 776 :	8 519 400 :	321 183 :	8 029 575 :
C1 :	0,03 g :	" :	" :	2 980 :		2 673 :	
C2 :	1 ml :	" :	" :	314 866 :	7 871 650 :	300 949 :	7 523 725 :
C3 :	1,3 g :	" :	" :	352 237 :		310 320 :	
C4 :	1 ml :	" :	" :	248 218 :	6 205 450 :	237 249 :	5 931 225 :
C5 :	2,13 g :	" :	" :	1 307 799 :		1 089 038 :	
C6 :	1 ml :	" :	" :	68 024 :	1 700 600 :	64 951 :	1 623 775 :
D1 :	1 ml :	" :	0 :	31 :		19 :	
D2 :	" :	" :	" :	33 :		20 :	
D3 :	" :	" :	" :	32 :		21 :	
D4 :	" :	" :	" :	45 :		24 :	
D5 :	" :	" :	" :	41 :		23 :	
D6 :	" :	" :	" :	39 :		23 :	
D7 :	" :	" :	" :	626 :	313 000 :	503 :	251 500 :
D8 :	" :	" :	" :	541 :	270 500 :	443 :	221 500 :
D9 :	" :	" :	" :	651 :	325 500 :	547 :	273 500 :

dans le milieu A le 3ème jour, l'échantillon A2 correspond au milieu de culture du mycélium A1, l'échantillon A3 correspond au mycélium prélevé dans le milieu A le 6ème jour etc... Les échantillons D1, D2, D3, correspondent aux aliquotes de la solution de Na OH prélevées le 3ème jour, D4, D5, D6, ont été prélevées le 6ème jour et D7, D8, D9 le 13ème jour.

Discussion : Sagissant de comptages sur le  $^{14}\text{C}$ , les canaux basse énergie et haute énergie ont été réglés respectivement entre 0 et 156 KeV et 4 et 156 KeV, les rapports CPMB CPMA pour tous les échantillons (aussi bien mycélium que milieux de culture) se situent entre 0,921 et 0,958 ce qui est considéré comme très satisfaisant et indique que le bruit de fond est tout au plus égal à quelques % de la valeur du comptage.

Seuls les échantillons de la solution de Na OH : D1 à D6 sont non significatifs car trop proches du seuil de détection de l'appareil et donc très perturbés par le bruit de fond. Ces mesures indiquent l'absence de  $^{14}\text{C}$  dans le  $\text{CO}_2$  piégé par la Soude jusqu'au 6iem jour. Les aliquotes D7, D8, D9 bien qu'ayant un CMPB CPMA non satisfaisant (< 0,850) montrent qu'il y a un début de dégagement de  $^{14}\text{CO}_2$  ce fait devra être pris en compte pour les cultures à venir et nous nous fixerons un temps de culture au plus égal à 10 jours.

En ce qui concerne les poids de mycélium récupérés après filtration dans les différents milieux, on peut observer une progression allant du milieu A au milieu C. Cette progression n'a rien de surprenant puisque le milieu A est un milieu minéral minimum appauvri, le milieu B est un milieu minéral complet et le milieu C un milieu organique très propice à la croissance des champignons. Examinons maintenant les rendements d'absorption de la Thymine marquée au  $^{14}\text{C}$ .

- Milieu A	: 3 jours	mycélium	= 0,2 %	:	milieu	= 85 %
	6 jours	"	= 10,4 %	:	"	= 57,5 %
	13 jours	"	= 31,9 %	:	"	= 22,5 %
- Milieu B	: 3 jours	"	= 0,8 %	:	"	= 84 %
	6 jours	"	= 0,2 %	:	"	= 86 %
	13 jours	"	= 0,8 %	:	"	= 77 %
- Milieu C	: 3 jours	"	= 0,03 %	:	"	= 72 %
	6 jours	"	= 3 %	:	"	= 56 %
	13 jours	"	= 11 %	:	"	= 15,5 %

Nous observons donc que les rendements d'absorption de la Thymine radioactive ne suivent pas les taux de croissance du champignon dans les différents milieux. Le milieu A, limitant pour la croissance mycélienne, est le plus favorable pour l'absorption de la Thymine. Dans le milieu C l'absorption est encore significative au bout de

13 jours alors que dans le milieu B l'absorption est pratiquement nulle. Notons enfin que les pertes de radioactivité sont probablement dues aux eaux de rinçage des mycélium au moment de la filtration.

b') Traitements des échantillons : Pour doubler l'expérimentation en historadiographie, nous avons envisagé de tenter de mesurer par scintillation la quantité de radioactivité entraînée dans les plants de maïs par le F. moniliforme marqué. Il est fort probable que les quantités de radioactivité que nous cherchons ainsi à mesurer seront très faibles car la croissance du parasite dans la plante amènera un facteur de dilution considérable. Le seuil de détection du  $^{14}\text{C}$  qui émet des radiations B de faible énergie posent un certain nombre de contraintes. En particulier, les fragments végétaux immergés dans le liquide scintillant entraîneront un quenching très important, nous avons donc cherché à réduire celui-ci en solubilisant chimiquement les fragments végétaux afin de libérer les molécules radioactives.

Différents essais avec de la Potasse, du réactif de Schweitzer (sulfate de Cu + Ammoniaque), de l'acide sulfurique et de l'acide nitrique ont montré que l'acide nitrique à 65% à chaud était la plus efficace pour dégrader les fragments végétaux. Tous les autres produits sont, soit peu efficaces, soit entraînent une intense coloration du milieu source de quenching important.

Nous avons donc mis en place une expérimentation directement sur une culture de Fusarium marquée pour vérifier la bonne dissolution du mycélium et la compatibilité de l'acide nitrique avec le milieu scintillant.

La souche 68 R a été mise en culture dans le milieu minéral minimum appauvri ayant donné précédemment les meilleurs rendements d'absorption de la  $^{14}\text{C}$  Thymine. Les échantillons ont ensuite subi les mêmes traitements que précédemment afin de récupérer, d'une part le mycélium et de l'autre le milieu de culture.

Dans les fiole à scintillation, nous avons ajouté 5 ml d'acide nitrique par gramme de mycélium, procédé à l'hydrolyse au bain marie à  $80^{\circ}\text{C}$  pendant 2 heures, puis nous avons effectué un comptage.

Le tableau IV récapitule les résultats obtenus pour 5 échantillons de culture :

A1, A3, A5, A7, A9 = mycélium  
A2, A4, A6, A8, A10 = milieux de culture correspondants.

Discussion : l'hydrolyse par l'acide nitrique du mycélium entraîne un dégagement de vapeur de  $\text{NO}_2$  (vapeurs

TABLEAU IV

## TRAITEMENT DES ECHANTILLONS

(Echantillons	: quantité:	: HNO 3	: Aquasol:	: Apport	: CPMA	: CPMA	: CPMB	: CPMB
(	: g. ou ml:		: 2	: <sup>14</sup> C CPM		: totaux		: totaux
(	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
( A1	: 0,48 g	: 2,4 ml	: 15 ml	: 1,18 107	: 30	:	: 13	:
( A2	: 1 ml	:	: "	:	: 64 095	: 1 602 375	: 61 279	: 1 531 975
( A3	: 0,30 g	: 1,5 ml	: "	: 1,18 107	: 146	:	: 23	:
( A4	: 1 cc	: -	: "	:	: 50 443	: 1 261 075	: 48 240	: 1 206 000
( A5	: 0,33 g	: 1,65 ml	: "	: 1,18 107	: 168	:	: 25	:
( A6	: 1 ml	: -	: "	: 1,18 107	: 69 124	: 1 728 100	: 65 649	: 1 641 212
( A7	: 0,4 g	: 2 ml	: "	: 1,18 107	: 45	:	: 13	:
( A8	: 1 cc	: -	: "	:	: 47 834	: 1 195 850	: 45 411	: 1 135 275
( A9	: 0,54 g	: 2,7 ml	: "	: 1,18 107	: 15	:	: 4	:
( A10	: 1 ml	: -	: "	:	: 80 000	: 1 999 991	: 75 784	: 1 894 592
(	:	:	:	:	:	:	:	:

rousses) et une complète dissolution de la matière organique.

Les quantités résiduelles de radioactivité présentes dans le milieu deculture sont de même ordre de grandeur que celles obtenues lors de l'expérimentation précédente (Tableau III), mais les comptages montrent que toutes la radioactivité des fioles contenant le mycélium a disparue, il est donc probable que le  $^{14}\text{C}$  s'est dégagé sous forme de  $^{14}\text{CO}_2$ .

Les procédés chimiques d'hydrolyse des fragments végétaux semblent donc inutilisables, nous emploieront des procédés mécaniques pour fragmenter en particules aussi fines que possible les échantillons végétaux préalablement séchés pour assurer leur bonne dispersion dans le milieu scintillant afin de limiter le quenching.

b) Historadiographie : Cette expérimentation étant en cours, nous n'en décrivons ici que la mise en place.

- mise en culture de F. moniliforme : La souche 68 R qui présente un niveau de toxicité élevé a été mise en culture dans trois lots de 10 erlens contenant 25 ml du milieu minéral minimum apauvri précédemment utilisé. Chaque erlen a reçu, après stérilisation et avant ensemencement 10 l d'une solution de  $^{14}\text{C}$  Thymine contenant 54  $\mu\text{Ci}$  de  $^{14}\text{C}$ . Cette séparation en trois lots est destinée à éliminer éventuellement un lot présentant une croissance défectueuse ou ayant mal assimilé le traceur radioactif. Après inoculation, les cultures sont mises en incubation 10 jours à 25° C avec une alternance de 12 heures de lumières 12 heures d'obscurité.

- mise en culture du maïs en serre : Les plants de maïs sont cultivés en pot, selon le système mis au point par la section d'agronomie de l'ORSTOM et précédemment décrit (rapport du 1er semestre). Chaque pot contient 5 kg de terre stérilisée à la chaleur puis mise au repos pendant 2 mois. Les éléments nutritifs N, P, K, sont apportés en solution selon les doses optimales pour la croissance du maïs soit :

- . 17, 5 g de Nitrate d'ammonium ;
- . 8, 6 g de dihydrogène phosphate de potassium ;
- . 2, 8 g de Sulfate de Potassium.

Les semences de maïs (variété synthétique Graffton A) sont désinfectées en formol à 1 % pendant 1 heure et mises en prégermination à l'étuve pour contrôler leur état phytosanitaire avant repiquage.

- Inoculation : l'inoculation et la plantation de graines prégermées se font simultanément. Après 10 jours d'incubation, le marquage radioactif a été contrôlé sur l'ensemble par lot de culture à l'aide du compteur à scintillation. Les comptages font apparaître les taux d'absorption suivants :

- . Lot 1 : 14 %
- . Lot 2 : 15, 8 %
- . Lot 3 : 13, 6 %

Les taux d'absorption étant du même ordre de grandeur nous avons regroupé les cultures.

Le mycélium a été abondamment lavé puis broyé grossièrement à l'Ultra Turrax à faible vitesse pour disperser le mycélium en brisant un minimum de cellules afin d'éviter une dispersion intempestive du  $^{14}\text{C}$ . L'expérimentation portant sur 30 pots nous avons ajusté le volume de l'inoculum à 30 ml afin d'apporter 1 ml par pot sous forme d'un anneau cerclant la graine germée repiquée au centre du pot.

- Prélèvements : afin de répondre aux principales interrogations qui se posent quant aux modalités d'invasion des plants de maïs à savoir :

- . s'agit-il d'une infection non systémique ; l'invasion des tissus nodaux résultant d'infections conidiennes multiples externes ?

- . s'agit-il d'une infection généralisée des tissus nodaux néoformes dès la 4ème ou 5ème semaine ?

- . s'agit-il d'une infection systémique ascendante classique ?

nous procéderons de la façon suivante.

La quatrième semaine, 6 plants seront sacrifiés, 2 seront analysés en historadiographie, 2 seront fragmentés et la recherche de radioactivité sera faite par scintillation, 2 enfin seront fragmentés puis repiqués sur milieu sélectif afin de contrôler la présence de F. moniliforme et de comparer le niveau de cette présence avec les résultats de l'historadiographie et des comptages en scintillation. Cette opération sera renouvelée les 6ème, 8ème, 11ème et 18ème semaine.

Cette expérience est actuellement en cours ; nous en détaillerons les résultats dans le prochain compte-rendu.

## CHIMIE - TOXICOLOGIE

Les premiers travaux de toxicologie (cf. rapport du 2ème semestre) ont permis de classer des souches, de F moniliforme isolées en Nouvelle-Calédonie, par ordre de toxicité croissante.

Nous nous sommes alors consacrés à l'étude de quelques souches pour tenter de donner une réponse aux principales interrogations qui se posaient :

- Pourquoi l'épreuve biologique considérée comme la mieux adaptée par l'équipe sud-africaine, à savoir l'administration per os à des canetons Pékin, ne produit pas, dans nos essais, les résultats escomptés ?

- Approfondissement des effets toxiques sur le rat. L'utilisation en routine de ces animaux est-elle concevable

- Tentatives de mise au point d'un nouveau test biologique : les cultures cellulaires.

- La toxicité observée sur rats est-elle liée à la L.E.M. ?

Après avoir mis en place l'infrastructure et maîtrisé les techniques nécessaires aux expérimentations (cf. rapport du 2ème semestre) nous avons obtenus les résultats suivants.

### A) Préparation et administration des substrats

#### I - Récapitulatif :

La nécessaire normalisation des cultures et des doses ainsi que les contraintes des études chimiques nous ont conduits à différentes évolutions qui sont récapitulées dans le tableau V et que nous allons commenter.

1) Série voie orale : cette colonne récapitule les numéros de série des différentes expérimentations par voies orales sur le rat (voir chapitre C).

2) Série I.P. : Comme ci-dessus, cette colonne permet de se reporter aux expérimentations sur rats par voie intrapéritonéale (voir chapitre C).

3) Souche : Inventaire des différentes souches étudiées.

4) Substrat - Nature et quantité : Nous avons utilisé essentiellement comme substrat du riz étuvé ou du maïs entier. Une tentative a été faite en utilisant, sous forme liquide, du "V8 Juice", une décoction de maïs et une décoction de petit pois ; les résultats toxicologiques espérés n'ayant pas été obtenus avec les milieux liquides,



TABLEAU V - PREPARATION ET ADMINISTRATION DES SUBSTRATS

DATES	SERIE VOIE ORALE	SERIE I.P.	SOUCHE	SUBSTRAT NATURE ET QUANTITE	DESTINATION	TRAITEMENT	ADMINISTRATION	EXTRACTIONS	RENDEMENTS	DOSES	REMARQUES
23/09/85	2	1/4	68R	Riz = 3 kg	rats	lyophilisé frais	per os + gavage " " " "	hydro-alcoolique " " "	123 mg/g lyo. 36,8 mg/g frais	0,28 g " " 50 %	culot + extrait " "
30/09/85	4		110	Riz = 3 kg	rats	lyophilisé frais	per os + gavage " " " "	hydro-alcoolique " " "	174 mg/g lyo. 58,4 mg/g frais	0,44 g 50 %	culot + extrait " "
04/10/85	3		68R	Liquide V8 maïs pt pois	rats	} broyat lyophi- lisé	} gavage		2,74 g/300 ml 2,35 g/300 ml	68,5 mg/ml 58,7 mg/ml	
25/10/85			MRC 826	Maïs = 3,6kg	canetons	sec	per os			50 %	complément IEMVT
25/10/85			68R	Maïs = 3,6kg	canetons	sec	per os			50 %	complément IEMVT
29/10/85	5		68B	Riz = 3 kg	rats	lyophilisé frais	per os + gavage " " " "	hydro-alcoolique " " "	260 mg/g lyo 125,6 mg/g frais	50 %	culot + extrait " "
12/11/85	2		Témoin	Riz = 1 kg	rats	frais	gavage	hydro-alcoolique	5 mg/g frais	0,038 g	
03/12/85	7/8		68R	Riz = 2,1kg	rats	frais	gavage	hydro-alcoolique	83,2 g/g frais infection probable	0,63 g	toxicité < à la normale infections ?
11/12/85	6		68R	Maïs = 9,6kg	rats	frais	gavage	hydro-alcoolique	36,4 g/g frais	0,28 g	toxicité < à la normale = t° incubation ?
					canetons	sec	per os			50 %	complément Poulette et IEMVT

TABLEAU V (suite)

DATES	SERIE VOIE ORALE	SERIE I.P.	SOUCHE	SUBSTRAT NATURE ET QUANTITE	DESTINATION	TRAITEMENT	ADMINISTRATION	EXTRACTIONS	RENDEMENTS	DOSES	REMARQUES
16/12/85	6		77	Riz = 0,5kg	rats	frais	per os			50 %	
16/12/85	6		110	Riz = 0,5kg	rats	frais	per os			50 %	
16/12/85	6		MRC 826	Riz = 0,5kg	rats	frais	per os			50 %	toxicité < à la normale
16/12/85	6		68 R	Riz = 0,5kg	rats	frais	per os			50 %	
16/12/86		1	Témoin	Riz = 600 g	rats	frais	I.P.	hydro-alcoolique	2,9 mg/g frais	0,022 g	
16/12/85	7/8	2	68 R	Riz = 2,4kg	rats	frais	gavage + I.P.	hydro-alcoolique	83,2 g/g frais infections probables	0,63 g	toxicité < à la normale infections ? partition H2O/ EtOH hexane
04/02/86			68B	Maïs = 2 kg	canetons	sec	per os			50 %	Poulette } Témoins maïs sain + Poulette et IEMVT
04/02/86			68B	Maïs = 4 kg	canetons	sec	per os			50 %	Poulette } Témoins maïs sain + Poulette et IEMVT
					rats	sec	gavage	hydro-alcoolique	31,1 mg/g frais	0,236 g	Témoin canetons
14/02/86	9/10	3/4	68R	Riz = 1,8 kg	rats	frais	gavage + I.P.	hydro-alcoolique	34,7 mg/g frais	0,263 g 0,0657 g 0,0263 g	Partition sur aliquote entre H2O et EtOH absolu (chronique)
14/02/86			68B	Riz = 1,8 kg	rats	frais	gavage	hydro-alcoolique	135 mg/g frais	1,03 g	Témoin chronique ci-dessus
05/03/86	11/12	1/5	68R	Riz = 3 kg	rats	frais frais	gavage + I.P. "	hydro-alcoolique aqueuse	64,6 mg/gfrais 68,7 mg/gfrais	0,491 g 0,522 g	Partition H2O/EtOH absolu

Tableau V (Suite)

DATES	SERIE VOIE ORALE	SERIE I.P.	SOUCHE	SUBSTRAT NATURE ET QUANTITE	DESTINATION	TRAITEMENT	ADMINISTRATION	EXTRACTIONS	RENDEMENTS	DOSES	REMARQUES
18/03/86	14	9	13	Maïs = 2,4kg	rats	sec	gavage + I.P.	aqueuse	63,6 mg/g sec	0,338 g	
18/03/86	14	9/12	MRC 826	Maïs = 2,4kg	rats canetons	sec sec	gavage + I.P. per os	aqueuse	87,6 mg/g sec	0,466 g 50 %	Témoin caneton Complément Poulette voir (21. 05.86)
09/04/86	13	6/8/11	68R	Riz = 3,6kg	rats canetons	frais frais	gavage + I.P. gavage	aqueuse aqueuse	100 mg/gfrais " " "	0,760 g "	2 phases : "huileuse" + aqueu- se + maïs sain + Poulette
19/04/86			68R	Maïs = 6,7kg	canetons	sec	per os			50 %	Contrôle ration alimentaire IEMVT
21/05/86			68B	Maïs = 10,4kg	canetons	sec	per os			50 %	Complément Poulette et IEMVT
21/05/86	14	7/9/11 12	68R	Maïs = 4,8kg	rats canetons	sec sec	gavage + I.P. gavage	aqueuse "	50 mg/g frais " "	0,38 g "	Témoin canetons Complément maïs sain + poulet- te
19/06/86	15		68R	Maïs = 15,2kg	cheval rats	sec sec	gavage gavage	aqueuse aqueuse	61 mg/g frais " "	130/65 g 0,46 g	Echelonnement de doses 1500 à 750 g maïs/jour Témoin cheval
18/07/86			MRC 826	Maïs = 4 kg	canetons	sec	per os	aqueuse	53 mg/g frais	ad. libitum	Poulette (culot, extrait, culture totale)
18/07/86	16/17	10/13/ 14/15/ 16/17	68R	Maïs = 10,5 kg	rats + cell VERO canetons	sec sec	gavage + I.P. per os	aqueuse aqueuse	52 à 63mg/gfrais 52 mg/g frais	0,4 à 0,48 g ad. libitum	Dialyse, acétone, charbon actif Poulette (culot, extrait, culture totale)

Tableau V (suite)

[illegible]

nous avons abandonné cette méthode. Progressivement le maïs a remplacé le riz, ceci s'explique par le fait que les extractions aqueuses sont nécessairement suivies de filtrations or, les extraits à partir de cultures sur riz sont très riches en amidons plus ou moins dégradés qui colmatent très rapidement les filtres. Les extraits à partir des cultures sur maïs entier sont moins difficiles à filtrer.

Les quantités exprimées représentent les poids de maïs ou de riz sains utilisés comme substrats de culture. Additionnés de 60 % d'eau avant stérilisation, ils sont ensemencés par une suspension conidienne de F. moniliforme puis incubés 21 jours à 25°C en moyenne avec une alternance de 12 h de lumière 12 h d'obscurité. Après 21 jours d'incubation on récupère la culture fraîche qui représente 91 à 93 % du substrat à 60 % d'humidité de départ. Les poids secs effectués sur ces cultures fraîches ont permis de constater qu'il n'y avait pas de pertes d'humidité mais une perte de matière, probablement sous forme de dégagement de CO<sub>2</sub> du au métabolisme du champignon.

5) Destination : Animaux ayant consommé la culture correspondante.

6) Traitement : Pour conservation ou prétraitement avant extraction, les cultures fraîches ont pu être, tout d'abord lyophilisées, puis, après que nous ayons eu la preuve que la toxicité n'était pas thermolabile, séchées dans un tunnel à air pulsé chauffé à 40°C par infra-rouge.

Par lyophilisation on obtient 30 à 32% en poids de la cultures fraîche.

Par séchage on obtient 46 à 48% en poids de la culture fraîche.

7) Administration : Les différentes cultures ont été administrées aux animaux de deux façons :

- Per os : Pour les rats le substrat est mélangé à 50% à un aliment commercial pour chien;

Pour les canetons, différentes compositions d'aliments ont été étudiées (voir chapitre B) que l'on retrouve dans la colonne "Remarques" sous les noms de "complément Poulette et ou complément IEMVT".

- Gavage : Nous avons désigné sous ce terme les sondages oesophagiens pratiqués selon la méthodologie décrite dans le rapport du 2ème semestre.

8) extractions : Les premières tentatives d'extraction ont été faites avec de l'éthanol à 80°, nous nous sommes ensuite rendu-compte que la toxicité était hydrosoluble ; nous ne pratiquons donc plus actuellement que des extractions aqueuses selon la technique suivante :

- Broyage au Waring Blendor de 200 g de culture

fraîche dans 1 litre d'eau permutée (ou 1 litre d'éthanol à 80°).

- Agitation pendant 4 heures.
- Centrifugation à 1500t minute pendant 1 2 heure.
- Récupération du surnageant.
- Filtration sur Buchner (préfiltre en silice de diatomées + filtre papier Whatmann).
- Evaporation au Rota-Vapor (40°C maximum).
- Lyophilisation de l'extrait concentré.

9) Rendements : Les rendements exprimés le sont en poids d'extrait lyophilisé par gramme de culture.

10) Doses : La dose de base utilisée a été calculée à partir des premières expérimentations de toxicité aigue sur rats, elle correspond à l'équivalent de 7,6 g de culture fraîche pour les gavages et les intra-péritonales.

Dans les tests per os les aliments contiennent, en règle générale 50% de culture et 50% de compléments divers selon que l'on a à faire à des rats ou à des canetons.

11) Remarques : Cette colonne contient les commentaires destinés à faciliter le suivi et l'interprétation des tests animaux.

## II - Chimie :

Afin de faire progresser parallèlement les études sur l'histo-pathologie de la toxicité de F. moniliforme et la détermination chimique de cette toxicité, le laboratoire de Chimie des Substances Naturelles a développé un programme d'extractions et de purifications des principes actifs présents dans les cultures.

Les premières tentatives d'extraction ont été faites avec de l'éthanol à 80° sur des cultures fraîches ou lyophilisées. Après avoir vérifié que l'essentiel de la toxicité se retrouvait dans la phase hydro-alcoolique (le culot n'en conservant qu'une partie résiduelle), une partition eau éthanol absolu a montré que la toxicité était préférentiellement soluble dans l'eau. Nous ne pratiquons donc plus maintenant que des extractions aqueuses.

La poursuite des opérations de purification a fait appel aux différents procédés de partitions chimiques ou physiques suivants :

- Partition par solvants de polarités différentes,
  - + Hexane
  - + Acétone
  - + Acétate d'éthyle
  - + Butanol
  - + Chloroforme.
- Partition par procédés physiques,
  - + Charbon actif
  - + Dialyse à 3500 et ou 1000.

Il est essentiel pour ces études de procéder à des tests de toxicité à chaque étape afin de déterminer les phases actives et les rendements toxicologiques de chaque partition. Les quantités de produits utilisables allant en s'amenuisant à chaque étape, ces tests ont été essentiellement effectués sur rats par la voie intra-péritonéale (I.P.)

Au cours des tests sur les différentes fractions nous nous sommes retrouvés confrontés à plusieurs problèmes

- Compatibilité biologique avec l'I.P. du solvant de redissolution des extraits ;

- Mauvaise répétitivité ;

- Artefacts ;

- Absence d'effet dose.

Ces problèmes ne sont pas entièrement résolus et la fiabilité des tests par I.P. ne sera prouvée qu'après corrélation avec les tests par sondages oesophagiens (gavages).

Ces préliminaires alourdissent considérablement le programme car les quantités de produit nécessaires pour les sondages oesophagiens sont importantes et plus proches d'une chimie préparative que d'une chimie analytique, c'est la raison pour laquelle nous tentons encore actuellement de mettre au point un nouveau test biologique utilisant les cultures de cellules comme indicateur de toxicité.

## **B) Toxicité sur canetons.**

Afin d'établir une relation entre les résultats obtenus chez le rat, et ceux qu'ont, par ailleurs, obtenus d'autres équipes chez le caneton Pékin, une expérimentation a été réalisée sur cette espèce animale dont voici les principaux résultats.

### **I - Préparation des aliments :**

Les cultures de Fusarium sont pratiquées sur maïs selon la technique habituelle puis séchées à 40°C et

broyées finement.

L'aliment définitif comprend 50% de maïs moisi et 50% d'aliment complémentaire. Ce dernier est, soit un aliment commercial pour poulette, soit un mélange dont les proportions de produit de base permettent d'obtenir un aliment final équilibré et correctement supplémenté en vitamines et acides aminés essentiels (mis au point par le D. BREGEAT Vétérinaire nutritionniste de l'I.E.M.V.T.). La composition des deux types d'aliments est donnée dans le tableau VI.

## II - Expérimentation animale :

Des lots de canetons Pékin de 1 jour sont composés de 4 à 8 individus suivant les disponibilités.

Les aliments sont distribués ad. libitum aux canetons dès le 2ème jour de vie sous forme de pâtée (farine eau 1 2, poids volume).

L'expérimentation est conduite pendant 15 jours. L'évolution du poids des animaux, les quantités d'aliments consommés, les éventuels signes cliniques et les lésions d'autopsie sont notés.

## III - Résultats et discussion

Quarante trois souches de F. moniliforme isolées en Nouvelle-Calédonie ont été éprouvées après avoir été incorporées à l'aliment IEMVT (voir rapport du 2ème semestre). Aucune mortalité n'a été observée chez les canetons. Les seuls symptômes d'intoxication observés furent : quelques signes d'anorexie, des retards de croissance, des défauts d'emplumement, quelques lésions du préventricule, quelques ulcérations de la muqueuse, du gésier et des entérites.

La même méthode utilisée pour tester une souche d'origine sud-africaine (souche MRC 826), considérée comme fortement toxigène pour le caneton par l'équipe de Marasas, a produit un résultat négatif.

Ces divergences entre nos résultats et ceux de Marasas nous ont conduits à incriminer le complément alimentaire utilisé et nous avons donc comparé le comportement des canetons soumis à un complément alimentaire équilibré (IEMVT) à celui des canetons soumis au complément alimentaire utilisé par les sud-africains (aliment commercial poulette) - (Tableau VII).

Les résultats de cette expérimentation mettent en évidence les faits suivants :

- Une faible assimilation de l'aliment poulette par rapport à l'aliment IEMVT. A consommation sensiblement égale, la perte de poids est de 50% chez les canetons nourris avec l'aliment du commerce.



TABLEAU VI

COMPOSITION DES DEUX TYPES D'ALIMENTS ETUDIES

	Aliment "poulette" commercial	Aliment IEMVT
Maïs fusarien	500	520 g
Soja	+	310 g
Farine de riz	-	120 g
Blé	150	-
Orge	50	-
Maïs	214	-
Sorgho	+	-
Son (brisures)	+	-
Tournesol	+	-
Farine de viande	84	-
Phosphate bicalcique	-	15 g
Sel	5	5 g
Méthionine	+	1 g
Lysine	+	-
Chaux	+	21 g
Antioxydant	-	0,5 g
Prémix		
- mat. minérale totale	+	1,4 g
- P	3,5 g	7 mg
- Ca	5 g	0,7 g
- NaCl	-	0,35 g
- Insolubles chlorhydriques	-	1,4 g
- Vit. A	7500 UI	1 260 000 UI
- Vit. D3	1000 UI	420 000 UI
- Vit. E	10 UI	2 100 UI
Vitamines A	-	500 UI
D3	-	125 UI
E	-	0,1 mg
B1	-	0,06 mg
B2	-	0,16 mg
B6	-	0,06 mg
C	-	1,5 mg
K3	-	0,08 mg
PP	-	0,1 mg

+ Présent en quantité indéterminée  
- Absent.

TABLEAU VII

TOXICITE SELON COMPOSITION DE LA  
RATION ALIMENTAIRE

Ration Alimentaire	nb. morts	Temps de survie	consommation tot.	Pds moyens	
	nb. total		par caneton	morts	vivants
Témoin IEMVT	0/18	-	566 g	-	363 g
Témoin Poulette	0/13	-	562 g	-	181 g
68R IEMVT	0/14	-	486 g	-	324 g
68R Poulette	20/20	5,2 j.	15 g	40,2 g	-
MRC 826 IEMVT	0/14	-	400 g	-	300 g
MRC 826 Poulette	10/13	5,8 j.	32 g	48 g	89 g
68B IEMVT	0/10	-	560 g	-	335 g
68B Poulette	0/10	-	240 g	-	131 g
68R Ext. aqueux (gavage) IEMVT	0/13	-	488 g	-	119 g
68R Ext. aqueux (per os) Poulette	4/7	8,7 j.	167 g	35 g	112 g
68R culot Poulette	5/7	7,7 j.	58 g	30 g	98 g
MRC 826 Ext. aq. (per os) Poulette	7/7	5 j.	28 g	38,5 g	-
MRC 826 culot Poulette	6/7	6,7 j.	54 g	33 g	106 g
68R IEMVT (- Pré-mix)	3/7	5 j.	190 g	39 g	123 g
68R IEMVT (-Vita-mines)	4/7	9,1 j.	228 g	54 g	140 g
68R IEMVT (-Méth-iomine)	6/7	8,7 j.	177 g	70 g	98 g
68R IEMVT (-1/2 soja)	7/7	4,2 j.	10 g	38 g	-
68R Poulette (+ 1/2 soja)	6/7	6,9 j.	57 g	40 g	67 g

- L'effet toxique n'apparaît que chez les canetons malnutris. Ainsi, la souche 68R, létale pour le rat de 20 jours, l'est également pour le caneton Pékin lorsqu'elle est incorporée à l'aliment du commerce. Dans ce cas, la mortalité intervient en 4 à 6 jours sans gain de poids des animaux intoxiqués. Dans les mêmes conditions expérimentales, la souche sud-africaine MRC 826 tue les canetons en 5 à 8 jours, ce qui confirme les résultats rapportés par Kriek.

- La souche 68B, non toxigène pour le rat, ne provoque pas de mortalité chez le caneton, quelque soit le type d'aliment auquel on l'incorpore.

- Lorsque la souche 68R, toxigène, est incorporée à la ration poulette, la consommation de l'aliment est 32 fois plus faible que lorsque cette souche est incorporée à la ration IEMVT. La présence de la souche 68R dans l'aliment du commerce induit donc un refus de nourriture très significatif chez les canards, ce phénomène n'est pas observé avec un aliment équilibré. Ce refus de nourriture semble dû à une action rapide de la toxine sur le tractus digestif des animaux ; les autopsies ont en effet révélé d'importantes lésions hémorragiques du tube digestif (intestin grêle) et des atteintes hépatiques après ingestion de l'aliment du commerce contaminé par une souche toxigène, alors que ces symptômes n'existent pas chez les canards ayant reçu l'aliment équilibré contaminé par la même souche.

- L'hypothèse qu'un ou plusieurs éléments de la ration IEMVT empêche (nt) la toxine de s'exprimer étant envisageable, nous avons abordé cette étude en supprimant dans la ration IEMVT différents éléments un par un. Les résultats (tableau VII) montrent que tous ces éléments sont indispensables puisque la suppression d'un seul d'entre eux suffit à rendre l'aliment toxique en présence de la souche 68R.

- L'extrait aqueux de la souche 68R est toxique pour les canetons quand le complément distribué à ces animaux est l'aliment poulette et non toxique quand le complément se compose de la ration IEMVT. La toxicité de l'extrait aqueux est inférieure à celle de la culture totale (temps de survie moyen respectif 5,2 jours et 8,7 jours) l'explication en est donnée par la présence de toxicité dans le culot, il est donc probable que l'extraction aqueuse n'épuise pas la toxicité d'une culture et que l'on ne récupère qu'une partie des principes toxiques. Nous verrons plus loin, en analysant les résultats de la toxicité sur rats, que la toxicité résiduelle du culot est de même nature que la toxicité de la fraction aqueuse de l'extrait.

La nature de ces résultats nous ont conduits à interrompre les expérimentations sur les canetons. Ces expérimentations reprendront si le besoin s'en fait sentir, en particulier pour trouver une éventuelle méthode de détoxification des lots de céréales contaminées par complémentation des rations alimentaires en un ou plusieurs éléments neutralisant les effets toxiques.

### **C Toxicité sur rats.**

#### **I - Toxicité générale :**

De nombreuses expérimentations sur rat de laboratoire (souche SPRAGUE-DOWLEY, âge 21 jours en début d'expérimentation) ont été conduites. Ces expérimentations ont concerné :

- Deux voies d'administration : voie orale quotidienne (per os ou par sondage oesophagien) ; voie péritonéale par injection unique.

- Cinq milieux de culture de champignons : riz en grain étuvé, maïs en grain, milieux liquides (maïs, V8, pois).

- Trois types d'extraits de cultures fusariennes : extraits hydro-alcoolique, aqueux, partitions chimiques.

- Six souches de F. moniliforme : MRC 826 (d'origine sud africaine), 13,68R, 68B, 77, 110.

1) Voies d'administration : Les protocoles d'intoxication des animaux, de suivis clinique, d'autopsie et d'histologie ont été décrit dans le rapport du 2ème semestre. Les deux voies d'administration sont utilisées de sorte que la dose soit totalement maîtrisée. Cette dose est de 50% de culture fusarienne pour 50% d'aliment commercial pour chien distribué ad libitum et pesé quotidiennement pour les tests per os et de 7.6 grammes équivalents de culture fusarienne fraîche pour les extraits, toujours administrés sous le volume de 1 ml.

Les expérimentations par voie orale ont concerné 477 animaux répartis en 17 séries et suivis cliniquement durant 5 à 50 jours selon les doses. Il a été pratiqué 445 autopsies qui ont donné lieu à la réalisation de 2500 coupes histologiques, 1500 d'entre elles restent à interpréter.

Les expérimentations par voie péritonéale ont concerné 300 animaux répartis en 17 séries. Plus de 100 autopsies ont été pratiquées, donnant lieu à la réalisation d'environ 400 coupes histologiques, la moitié d'entre elles restent à interpréter

2) Milieux de culture : Par expérience, deux milieux se sont avérés les plus propices à la toxicogénie ; il s'agit des milieux solides riz entier et maïs entier qui

paraissent équivalents sur le plan cultural et toxicogénique. Les milieux liquides V8, maïs et pois n'ont pas permis de mettre en évidence la présence de toxicité après culture de la souche 68R.

Le milieu maïs entier est le seul utilisé maintenant de par les facilités d'extractions qu'il offre par rapport au riz.

3) Extraits de culture : Les premières expériences ont porté sur des extraits hydro-alcoolique tandis que le riz contaminé ayant subi l'extraction (appelé culot dans le tableau V et VIII) était incorporé (à 50% en poids) dans l'aliment commercial pour chien pour être testé parallèlement.

Les temps de survie des animaux, leur évolution pondérale, les examens cliniques, nécropsiques et histologiques ont montré :

- Que les extraits totaux des cultures des souches 68R et MRC 826 sont hautement toxiques.

- Que l'administration par voie péritonéale entraîne la mort en 20 à 60 minutes selon la souche et la culture.

- Que le riz ou le maïs après extraction renferme une toxicité résiduelle qui est de même nature que celle provoquée par les extraits. Ultérieurement, des partitions alcool-eau de ces extraits hydro-alcoolique ont été réalisées, elles ont donné une fraction aqueuse très toxique (comparable à la toxicité de l'extrait total) et une fraction alcoolique de toxicité moyenne dont la nature est comparable à celle de l'extrait total. Nous en avons conclu que le(s) principe(s) toxique(s) est (sont) hydrosoluble(s), de polarité telle que sa (leur) solubilité dans l'éthanol reste importante.

Actuellement, nous travaillons sur des extraits aqueux stricts. Différentes partitions ont été réalisées à partir de ces extraits aqueux :

- Précipitation à l'acétone ;

- Solubilisation dans l'acétate d'éthyle, le butanol ou le chloroforme;

- Adsorption sélective sur charbon actif ;

- Dialyse à 3500 et ou à 1000.

4) Les souches fusariennes : Les examens nécropsiques et histologiques ont permis de constater que toutes les souches étudiées entraînent chez le rat une toxicité de même nature ; c'est la différence d'intensité du pouvoir toxique qui permet de classer les souches en peu toxiques, toxiques, très toxiques.

A la même dose, les souches peu toxiques (68B et 77) n'entraînent aucune différence clinique par rapport aux animaux témoins. Par contre, l'autopsie et l'histologie permettent de reconnaître des lésions subtiles sur les organes cibles que les souches toxiques et très toxiques affectent.

Les souches toxiques (110) entraînent au plan clinique un simple retard de croissance et montrent au plan lésionnel une action toxique plus marquée mais sur les mêmes organes.

Les souches très toxiques (68R et MRC 826) induisent une symptomatologie aiguë (diarrhée - arrêt d'alimentation - perte de poids importante - ictère - mortalité en 3 à 6 jours) et une atteinte lésionnelle majeure de plusieurs organes.

La bonne reproductibilité des résultats cliniques, nécropsiques et histologiques leur confère une valeur significative et désigne le rat comme un bon sujet de test.

## II - Récapitulatif des expérimentations sur rats par voies orales :

Le tableau VIII récapitule les différentes séries d'expérimentations sur rats. Les comptes rendus nécropsiques et histologiques sont, à l'heure actuelle, incomplet. Nous d'exposerons dans ce rapport qu'un compte-rendu portant sur les effets de la souche 68R. Les comptes rendus détaillés portant sur les autres souches seront exposés dans le prochain rapport.

Certaines "anomalies" concernent les séries 6, 8, 14, 16, et 17.

- Série 6 : Les cultures des souches 68R et MRC 826 de cette série ont été victimes d'une mauvaise température d'incubation qui a atteint 30°C, il est probable que cette température excessive est responsable de la perte de toxicité des cultures.

- Série 8 et 14 : Les cultures de la souche 68R de ces deux séries ont été contaminées l'une par un inoculum bactérien, l'autre par une invasion d'accariens.

- Série 16 et 17 : La perte de la toxicité aiguë consécutive aux partitions chimiques est à l'heure actuelle inexpliquée, une nouvelle expérimentation est en cours pour tenter d'établir le lien entre l'action du charbon actif et de l'acétone et la perte de toxicité des extraits par voie orale.

TABLEAU VIII

## EXPERIMENTATION SUR RATS PER OS OU PAR SONDAGE OESOPHAGIEN

Série	Lot	Per os/ gavage	Ration alimentaire	GMQ/CMQ	Morts/ Total	T. moyen de survie
2	1	gavage	68R ext. hydro alcoolique frais dose 1	-10,68	5/5	2,4 j.
	2	gavage	68R ext. hydro alcoolique lyophi- lisé dose 1	-19,29	5/5	2 j.
	3	per os	Témoin Riz	0,183	0/5	> 10 j. (sacrifié)
	4	per os	68R Total frais 50 %	- 6,42	5/5	6,6 j.
	5	per os	68R culot lyophilisé 50 %	- 6,23	5/5	7,4 j.
	6	per os	68R culot frais 50 %	- 1,125	5/5	15,4 j.
	7	gavage	68R ext. hydro alcoolique frais dose 1/2	- 8,65	5/5	4,2 j.
	8	gavage	idem - dose 1/4	- 3,02	5/5	6,8 j.
	9	gavage	68R ext. hydro. alcoolique lyo- philisé dose 1/2	-11,06	5/5	3,6 j.
	1	gavage	Milieu + culture 68R sur V8 juice	0,433	0/4	> 10 j.
	2	gavage	Milieu + culture 68R sur maïs li- quide	0,33	0/4	> 10 j.
	3	gavage	Milieu + culture 68R sur petit pois liquide	0,437	0/4	> 10 j.

TABLEAU VIII (Suite)

Série	Lot	Per os/ gavage	Ration alimentaire	GMQ/CMQ	Morts/ Total	T. Moyen de survie
3	4	gavage	Milieu V8 juice témoin	0,266	0/4	> 10 j.
	5	gavage	Milieu maïs liquide témoin	0,35	0/4	> 10 j.
	6	gavage	Milieu petit pois liquide témoin	0,457	0/4	> 10 j.
	7	per os	Témoin aliment chien	0,400	0/4	> 10 j.
4	1	gavage	llo ext. hydro. alcoolique frais dose 1	0,38	0/5	> 14 j.
	2	gavage	idem - dose 1/4	0,37	0/5	> 14 j.
	3	gavage	idem - lyophilisé dose 1	0,21	0/5	> 14 j.
	4	gavage	idem - lyophilisé dose 1/4	0,38	0/5	> 14 j.
	5	gavage	ext. hydro. alcoolique riz sain dose 1	0,406	0/5	> 10 j.
	6	per os	llo total frais 50 %	0,09	0/5	> 14 j.
	7	per os	llo culot lyophilisé 50 %	0,29	0/5	> 14 j.
	8	per os	llo culot frais 50 %	0,25	0/5	> 14 j.
	9	per os	Témoin aliment chien	0,34	0/5	> 10 j.



TABLEAU VIII (Suite)

Série	Lot	Per os/ gavage	Ration alimentaire	GMQ/CMQ	Morts/ total	T. moyen de survie
5	1	gavage	68B ext. hydro alcoolique frais dose 1	0,384	0/5	> 14 j.
	2	gavage	idem lyophilisé dose 1	0,346	0/5	> 14 j.
	3	per os	68B culot frais 50 %	0,187	0/5	> 14 j.
	4	per os	68B culot lyophilisé 50 %	0,136	0/5	> 15 j.
	5	per os	Témoin aliment chien	0,355	0/5	> 15 j.
	6	per os	68B totale 50 %	0,031	0/5	> 15 j.
6	1	per os	68R totale 50 %	-0,05	0/4	> 11 j.
	2	per os	110 totale 50 %	-0,041	0/4	> 11 j.
	3	per os	MRC 826 totale 50 %	0,021	0/4	> 11 j.
	4	per os	77 totale 50 %	-0,023	0/4	> 11 j.
	5	per os	68R culot 50 %	0,48	0/4	> 11 j.
	6	per os	Témoin aliment chien	0,25	0/4	> 11 j.
	7	gavage	68R ext. hydro. alcoolique maïs frais dose 1	0,325	0/4	> 11 j.

TABLEAU VIII (Suite)

Série	Lot	Per os/ gavage	Ration alimentaire	GMQ/CMQ	Morts/ total	T. moyen de survie
	8	gavage	68R ext. hydro. alcoolique riz frais dose 1/2	0,265	0/3	> 11 j.
	9	gavage	idem - dose 1	0,27	3/3	4 j.
	1	gavage	68R ext. hydro alcoolique frac- tion EtOH dose 1	0,45	1/5	> 5 j.
	2	gavage	idem fraction H2O dose 1	-0,46	5/5	2,7 j.
7	3	gavage	idem fraction EtOH dose 1/2	0,296	0/5	> 10 j.
	4	gavage	idem fraction H2O dose 1/2	0,22	0/5	> 10 j.
	5	per os	Témoin aliment chien	0,33	0/5	> 10 j.
	1	gavage	68R ext. hêxane repris dans DMSO	0,29	0/5	> 10 j.
	2	gavage	68R ext. EtOH	0,382	0/5	> 10 j.
8	3	gavage	68R ext. H2O	0,104	0/5	> 10 j.
	4	gavage	Témoin DMSO 5 %	0,378	0/5	> 18 j.
	5	gavage	Témoin Tween 1 %	0,38	0/5	> 18 j.
	6	per os	Témoin aliment chien	0,46	0/5	> 10 j.
	1	gavage	68R ext. hydro alcoolique dose 1/10 (femelles)	0,206	0/4	> 40 j.

TABLEAU VIII (Suite)

Série	Lot	Per os/ gavage	Ration alimentaire	GMQ/CMQ	Morts/ total	T. moyen de survie
9	2	gavage	idem (mâles)	0,206	0/4	> 40 j.
	3	gavage	idem (mâle + femelle) dose 1/4	0,227	0/4	> 35 j.
	4	gavage	idem (mâle + femelle) dose 1	-0,48	4/4	6 j.
	5	gavage	68B ext. hydro alcoolique dose 1 (femelle)	0,3	0/5	> 30 j.
	6	gavage	idem (mâles)	0,264	0/5	> 30 j.
	7	per os	aliment chien (femelles)	0,228	0/4	> 40 j.
	8	per os	aliment chien (mâles)	0,263	0/4	> 40 j.
10	1	gavage	68R ext. hydro alcoolique dose 1	-0,64	4/4	3 j.
	2	gavage	idem fraction EtOH	0,369	0/4	> 25 j.
	3	gavage	idem fraction H2O	-3,76	3/4	19 j.
11	1	gavage	68R ext. hydro alcoolique dose 1	0,820	4/4	3 j.
	2	gavage	68R ext. aqueuse filtration fine dose 1	-1,15	4/4	3,75 j.
	3	gavage	68R ext. aqueuse centrifugation dose 1	-0,84	4/4	3 j.
	4	per os	Témoin aliment chien	0,34	0/4	> 10 j.

TABLEAU VIII (Suite)

Série	Lot	Per os/ gavage	Ration alimentaire	GMQ/CMQ	Morts/ total	T. moyen de survie
12	1	gavage	68R ext. hydro alcoolique soluble H2O	-5,729	4/4	2,5 j.
	2	gavage	idem insoluble H2O	-4,82	4/4	2,75 j.
	3	gavage	idem soluble EtOM	-1,033	4/4	2,75 j.
	4	gavage	idem insoluble EtOM	-1,821	4/4	3 j.
13	1	gavage	68R ext. aqueuse dose 1	-0,458	3/4	9 j.
	2	gavage	68R ext. aqueuse phase "huileuse"	0,324	0/4	> 12 j.
	3	per os	Témoin aliment chien	0,435	0/4	> 12 j.
14	1	per os	Témoin aliment chien	0,372	0/5	> 12 j.
	2	gavage	68R ext. aqueuse dose 1	0,18	0/5	> 12 j.
	3	gavage	MRC ext. aqueuse dose 1	0,052	3/5	9 j.
	4	gavage	13 ext. aqueuse dose 1	0,26	0/5	> 12 j.
15	1	gavage	68R ext. aqueuse dose 1	-0,363	5/5	5 j.
	2	per os	Témoin aliment chien	0,416	0/5	> 10 j.
	1	gavage	68R dialysé à 1000 du précip. Acétone	0,218	0/4	> 14 j.

TABLEAU VIII (Suite et fin)

Série	Lot	Per os/ Gavage	Ration alimentaire	GMQ/CMQ	Morts/ Total	T. moyen de survie
16	2	gavage	68R dialysat à 1000 de la phase aqueuse ch. actif	0,042	0/4	> 14 j.
	3	gavage	68R dialysat à 1000 du précip. Acétone	0,247	0/4	> 16 j.
	4	gavage	68R phase alcoolique du ch. actif	0,432	0/4	> 30 j.
17	1	gavage	68R soluble + précipité à 1'Acé- tone du dialysé à 1000	0,243	0/4	> 10 j.
	2	gavage	68R dialysat + dialysé à 1000 du précip. Acétone	0,166	0/4	> 10 j.
	3	gavage	68R sol. + insol. Acétone du dia- lisé à 1000 + dialysat phase aqueuse ch. actif + phase alcoo- lique	0,063	0,4	> 10 j.
	4	per os	Témoin aliment chien	0,426	0/4	> 10 j.

## 1 - Résultats nécropsiques :

### a) Les organes macroscopiquement lésés :

- estomac : fréquemment dilaté, tout particulièrement avec les doses les plus fortes, chez des animaux trouvés morts. Cette alérations est assurément liée au sondage gastrique quotidien, et aux fermentations post-mortem ; cependant, son intensité suppose une atteinte ante-mortem.

- intestin : contenu intestinal toujours très liquide, teinté de jaune, qui coïncide avec les signes cliniques de diarrhée. La couleur jaune est difficilement attribuable à une chasse biliaire post-mortem chez ces animaux dépourvus de vésicule biliaire. L'atteinte porte préférentiellement sur les segments antérieurs du grêle.

- foie : toujours décoloré de façon proportionnelle au temps de survie des animaux. La pesée révèle en outre des variations par rapport aux animaux témoins.

- rate : les pesées révèlent pour cet organe des baisses de poids chez les animaux traités, sans modification macroscopiquement visible.

- thymus : cet organe est également atrophié chez les animaux traités, perdant sa forme caractéristique et sa consistance. Les pesées fournissent des données chiffrées très significatives.

Enfin, de nombreux tissus et organes prennent une teinte jaune, attribuée à un ictère, et que confirment les constatations cliniques.

### b) Les relations effet-dose :

- Aliments solides toxiques : une seule dose a été éprouvée, qui induit des lésions de même ampleur que l'extrait total sous sa dose de base (dose 1 = 7,6 grammes-équivalent de culture fraîche par jour).

- Extraits administrés par sondage gastrique : l'atteinte intestinale est difficilement fiable à la dose, tandis que l'atteinte gastrique est constatée pour les diverses doses éprouvées (doses 1, 1 2, 1 4). Pour les foies, rates et thymus, les poids moyens relatifs de ces organes montrent des variations.

On doit donc considérer qu'il y a une relation effet-dose pour ce qui concerne l'atteinte splénique et thymique, qui doit aussi être perçue comme une relation effet temps de survie, puisqu'il y a presque doublement de celui-ci lorsque la dose est divisée par deux.

TABLEAU IX

Extrait	Dose (g. éq/rat/j.)	Poids relatifs moyens (%)		
		Foie	Rate	Thymus
Extrait Hydro Alcoolique	0	4,70	0,240	0,350
	7,6	4,21	0,220	0,305
	3,8	5,22	0,220	0,205
	0	4,70	0,240	0,350
	7,6	4,56	0,220	-
	3,8	5,49	0,225	0,205
Fraction aqueuse de l'extrait brut	0	4,20	0,240	0,360
	7,6	5,40	0,227	0,201
	3,8	4,50	0,240	0,300
Fraction alcoolique de l'extrait brut	0	4,20	0,240	0,360
	7,6	4,82	0,240	0,196
	3,8	4,86	0,225	0,307
Extrait aqueux	0	3,90	0,195	0,310
	3,8	5,96	0,160	0,080

L'atteinte hépatique reconnaît les mêmes relations dose-effet-temps de survie, qui sont évidentes lorsqu'on tient compte des aspects histologiques des organes pour interpréter les valeurs ci-dessous. (Tableau IX)

## 2 - Résultats histologiques :

### a) Confirmation des lésions macroscopiques :

- estomac : la partie glandulaire de l'estomac est toujours marquée par des altérations lytiques qui reconnaissent une composante de nécrose et d'autolyse. La sous muqueuse est souvent oedématisée. La portion malpighienne semble marquée par une réduction des couches kératinisées.

, - intestin : on note une destruction épithéliale, un afflux lymphocytaire dans le chorion et un oedème des villosités, ces trois lésions déclinant d'amont en aval.

Les fortes doses ont un effet brutal qui privilégie les atteintes d'oedème et de nécrose, tandis que les doses plus faibles entraînent un afflux lymphocytaire plus important.

- foie : les atteintes hépatiques sont chronologiquement une perte de la glycogénose physiologique du jeune rat, puis une surcharge graisseuse et une nécrose hépatocytaire disséminée. Les fortes doses privilégient les lésions de nécrose, d'où la diminution des poids relatifs de ces foies par perte de leur surcharge glycogéniques tandis que les faibles doses induisent des surcharges graisseuses des hépatocytes d'où, au contraire, élévation des poids d'organes. Ces deux atteintes sont les marques d'une même souffrance hépatique, variant selon la brutalité de l'effet toxique.

- rate et thymus : les atrophies de ces deux organes correspondent histologiquement à une régression de la lignée lymphoïde, pouvant atteindre un niveau extrême, où l'on reconnaît de nombreux débris nucléaires et de nombreuses cellules histiocytaires dans les lobules thymiques.

### b) Découvertes histologiques :

Elles portent sur les reins, affectés de façon bilatérale par des lésions de nécrose tubulaire.

Ces lésions portent sur les tubes contournés proximaux dont les cellules se vacuolisent avant d'évoluer véritablement vers la nécrose. Les structures glomérulaires sont épargnées ; aucune réaction inflammatoire n'est associée à l'atteinte tubulaire.



### III - RECAPITULATIF DES EXPERIMENTATIONS SUR RATS PAR VOIE PERITONEALE :

Les tableaux X, XI, et XII résument les différentes séries d'expérimentations. Comme pour celles par voies orales, les comptes rendus nécropsiques et histologiques sont, à l'heure actuelle, incomplets. Ils paraîtront dans le prochain rapport. Tout au plus pouvons-nous signaler que les lésions les plus tangibles sont :

- Hémorragies intramuqueuses de l'estomac et de l'intestin ;

- Nécrose du cortex rénal.

Cette voie d'administration donne une relation dose-effet très marquée avec une nette augmentation du temps de survie lorsque la dose administrée diminue. Certaines séries sont entachées d'anomalies (mauvaises répétitivité, artéfacts). Pour une partie d'entre elles, on peut attribuer ces anomalies à des accidents d'injection (injections sous-cutanées) ou à l'hétérogénéité des animaux utilisés, tout particulièrement en âge qui fixe les limites d'application du test ; nous avons constaté que la sensibilité des animaux diminue considérablement après 26-28 jours. Pour une autre partie, la toxicité péritonéale est sujette à caution et semble se dissocier de la toxicité aiguë par voie orale. En effet les séries d'extractions suivantes ayant été réalisées :

- Le fractionnement 1 montre que le dialysat et le dialysé à 3500 sont toxiques ce qui laisse présumer la présence de 2 principes actifs de poids moléculaires l'un supérieur, l'autre inférieur à 3500.

- La précipitation à l'acétone (tableau XI) montre qu'après épuisement, la toxicité se retrouve dans la fraction précipitée. Ce précipité, dialysé à 3500 montre que la toxicité se retrouve uniquement dans le dialysé donc en contradiction avec le fractionnement précédent ce qui peut laisser penser que la précipitation à l'acétone dénature la molécule active dont le poids moléculaire est inférieur à 3500.

- L'adsorption sur charbon actif donne une phase alcoolique non toxique et une phase aqueuse toxique (tableau XI). La phase aqueuse dialysée à 1000 donne un dialysé toxique respectant l'effet dose (tableau XI) et un dialysat également toxique mais sans effet dose. La même phase aqueuse précipitée à l'acétone montre que la toxicité se retrouve dans le précipité.

- En 4 (tableau XIV) le précipité à l'acétone de la phase aqueuse du charbon actif a été dialysé à 1000 et, en contradiction avec le fractionnement 2 (tableaux XIII et XI), le dialysat et le dialysé sont toxiques. (tableau XII)

TABLEAU X  
EXPERIMENTATION SUR RAT VOIE PERITONEALE

Substrat	Séries	nb morts		Temps de survie
		total dose x l		
<hr/>				
EXTRAIT AQUEUX 68R/RIZ :	1/5/ 11			15-30'
EXTRAIT AQUEUX 68R/MAIS :	1/2/7/			
↳Extrait Total	9/10/11	20/22		15-30'
↳Dilutions { 1/2	12 2/12	4/4		1h30'
{ 1/4	2/12	3/4		2h
{ 1/8	12	0/4		7 j.
EXTRAIT AQUEUX MRC 826/MAIS :				
↳Extrait Total	9/12			10-20'
↳Dilutions { 1/2	12	4/4		1h30'
{ 1/4	12	2/4		2h40'
{ 1/8		-		-
EXTRAIT	4			
↳Acétone { Soluble	8	0/4		-
{ Insoluble	8	3/4		2h
↳Acétate d'Ethyle { Soluble	8	0/4		-
{ Insoluble	8	4/4		27'
↳Butanol { Soluble	8	2/4		1h40'
{ Insoluble	8	4/4		2h
↳Chloroforme { Soluble	8	0/4		-
{ Insoluble	8	4/4		20'
Ethanol Soluble	1/3/4			
Insoluble	1			
Eau Soluble	3/4/6/			
Insoluble	3/6/			

TABLEAU XI

## EXPERIMENTATION SUR RAT VOIE PERITONEALE

Substrat	Séries	nb morts	Temps de	nb morts	Temps de	nb morts	Temps de
	13/14	total	survie	total	survie	total	survie
	15	dose x 2		dose x 1		dose x 1/4	
-----							
EXTRAIT AQUEUX TOTAL:							
→ Dialysé Total		2/2	35'				
→ Dialysat Total		3/3	14'				
→ Précipité I		2/2	36'				
→ Soluté I		2/2	30'				
→ Dialysé		2/2	32'				
→ Dialysat		0/2					
→ Précipité 3				3/3	47'		
→ Soluté 3				-	-		
→ Précipité II				-	-		
→ Soluté II				0/3	-		
Adsorption s/ Charbon							
→ Phase aqueuse		3/3	33'				
→ Phase alcool.		0/3	-				
→ Précipité eau		0/4	-				
→ Soluté eau		-	-				
→ Dialysé		4/4	1h30'	4/4	3h	2/2	4h30'
→ Dialysat		4/4	4h	4/4	4h	1/3	4h30'
→ Précipité		3/4	1h				
→ Soluté		0/4	-				

TABLEAU XII

## EXPERIMENTATION SUR RAT VOIE PERITONEALE

Substrat	Séries:	nb morts		Temps de survie
		total dose x l		
-----				
EXTRAIT AQUEUX TOTAL 68R :				
↓				
Adsorbtion s/Charbon				
●Phase Aqueuse				
.Phase Alcoolique	16	0/2		-
→ { Solute	16	0/3		-
Précipité ●				
.Dialysat	16	3/3		3h30'
.Dialysé	16	3/3		1h
+ Sels ?				
→ { Dialysat	16	3/3		4h30'
Dialysé ●				
.Soluté	16	2/2		3h
.Précipité	16	2/3		2h30'
+ Sels ?				
EXTRAIT AQUEUX TOTAL 68R :				
●→ { Dialysé	17	4/4		40'
Dialysat ●				
.Dialysé	17	0/4		
.Dialysat	17	0/4		

- La précipitation à l'acétone du dialysé à 1000 de la phase aqueuse du charbon actif, donne un soluté et un précipité toxiques en contradiction avec les fractionnements 2 et 3.

- Pour faire la preuve que nous avons à faire à un complexe toxique dont une des composante a un poids moléculaire supérieur à 3500 et l'autre inférieur à 3500 voire à 1000 (1, 2, 3 et 4 tableaux XIII et XIV), nous avons dialysé à 3500 un extrait aqueux total (5 tableau XIV), le dialysat obtenu a été dialysé à 1000. Logiquement nous devions obtenir un dialysé à 3500 toxique, un dialysat à 1000 non toxique et un dialysé à 1000 toxique. Nous avons bien obtenu un dialysé à 3500 toxique mais ni le dialysat ni le dialysé à 1000 était toxique. Cet extrait aqueux total n'ayant pas subi de précipitation à l'acétone comme en 2, ce résultat est inexplicable.

- Pour lier les tests intrapéritonéaux aux tests par sondages oesophagiens, nous avons administré à des rats par gavage les fractions suivantes :

- . phase alcoolique du charbon actif ;
- . dialysat du précipité à l'acétone de la phase aqueuse du charbon actif ;
- . dialysé du précipité à l'acétone de la phase aqueuse du charbon actif.

La série 16 du tableau VIII montre que hormis le lot ayant absorbé le dialysat de la phase aqueuse du charbon actif qui a légèrement réagi, aucun des animaux traités n'a présenté de signes cliniques d'intoxication.

Pour en avoir le coeur net, nous avons réunis certaines fractions de la partition 4 (tableau XIV) pour obtenir :

- . un soluble + un précipité à l'acétone du dialysé à 1000 de la phase aqueuse du charbon actif ;
- . un dialysat + un dialysé à 1000 du précipité à l'acétone de la phase aqueuse du charbon actif ;
- . un soluble + insoluble à l'acétone du dialysé à 1000 + le dialysat de la phase aqueuse du charbon actif + la phase alcoolique du charbon actif.

Là encore, les résultats ont été négatifs. (série 17 tableau VIII)

L'absence de corrélation entre les tests utilisant la voie péritonéale et la voie par sondages oesophagiens est préoccupante. Dans un premier temps, les résultats négatifs par sondages oesophagiens exposés ci-dessus vont

TABLEAU XIII

1) Extrait aqueux souche 68R → dialyse 3500 → dialysat  
 → dialysé

-----

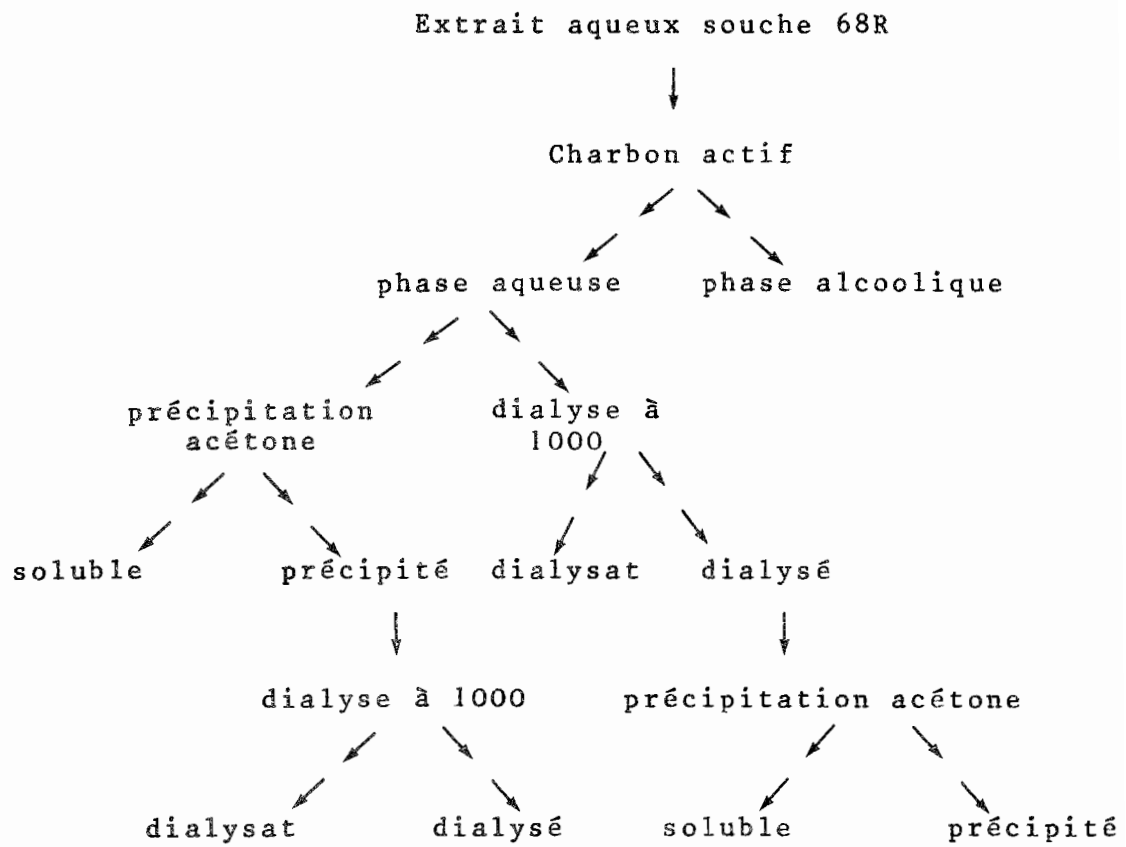
2) Extrait aqueux souche 68R  
 ↓  
 Précipitation Acétone  
 ↙ ↘  
 Précipité Soluble  
 ↓ ↓  
 Dialyse 3500 Précipitation Acétone  
 ↙ ↘ ↙ ↘  
 dialysat dialysé soluble précipité

-----

3) Extrait aqueux souche 68R  
 ↓  
 Charbon actif  
 ↙ ↘  
 phase aqueuse phase alcoolique  
 ↙ ↘ ↙ ↘  
 dialyse à 1000 précipitation acétone  
 ↙ ↘ ↙ ↘  
 dialysat dialysé soluble précipité

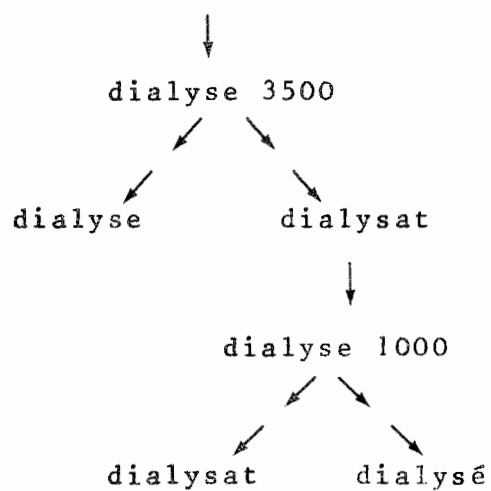
TABLEAU XIV

4)



5)

Extrait aqueux souche 68R



être examinés.

Nous allons tester l'effet du charbon actif et de l'acétone sur l'extrait aqueux total et approfondir les incidences de la partition par dialyse qui nous semble la plus prometteuse, car la moins agressive vis-à-vis des principes toxiques.

Enfin, nous allons développer les cultures cellulaires comme éventuel test biologique de substitution.



TEST D'INHIBITION DE CROISSANCE  
SUR CELLULES VERO : PROTOCOLE

I - PREPARATION DES DIFFERENTS MILIEUX ET SOLUTIONS

1 - Préparation du mélange d'antibiotiques pour cultures cellulaires

1.1. concentration par ml de milieu de culture

Pénicilline G : 100 UI/ml  
Streptomycine : 100 µg/ml  
Kanamycine : 100 µg/ml  
Fungizone : 2,5 µg/ml

1.2. préparation de 250 ml de solution-mère d'antibiotiques

Pénicilline G : 1.000.000 UI  
Streptomycine : 1.000 mg  
Kanamycine : 1.000 mg  
Fungizone  
(0,25 mg/ml) : 100 ml (= 25 mg)  
Eau distillée : 150 ml

Filtration sur Millipore 0,22 µ.

Répartition en flacons de 5 ml.

1.3. utilisation pour 200 ml de milieu de culture

Utilisation à raison de 1 fl. de 5 ml pour 200 ml de milieu.

2 - Préparation du mélange d'antibiotiques pour prétraitement des extraits

2.1. concentration par ml de milieu de culture

Pénicilline G : 1.000 UI/ml  
Streptomycine : 1.000 µg/ml  
Kanamycine : 1.000 µg/ml

2.2. préparation de 50 ml de solution-mère

Pénicilline G : 5 M UI  
Streptomycine : 5 g  
Kanamycine : 5 g  
Eau distillée : 50 ml  
Filtration sur Millipore 0,22  
Préparation en flacons de 5 ml.

## 2.3. utilisation

Utilisation à raison de 0,1 ml/10 ml d'extrait.

### 3 - Préparation de la solution de PBS (Phosphate Buffer Saline)

PBS en poudre BioMérieux : 1 flacon par litre d'eau distillée.

### 4 - Préparation de la trypsine pour les différentes méthodes employées

Solution de trypsine 10 x à 2,5 % (BioMérieux) diluée au 1/10ème dans du PBS ==> solution à 0,25 %.

### 5 - Préparation du milieu de croissance : milieu de Eagle minimum (M.E.M.)

#### 5.1. préparation du M.E.M.

- Dissoudre progressivement le contenu d'un sachet de poudre de sels de Earle sans bicarbonate dans 5 litres d'eau distillée.
- Ajuster le pH à 7,0 environ (environ 300 µl NaOH). Celui-ci se modifiera à la filtration et à l'adjonction du bicarbonate.
- Ajouter le bicarbonate (NaHCO<sub>3</sub> - BioMérieux) dans les conditions suivantes :

:	:	:	:
:	:	MEM 0,85	:
:	:	:	:
:	HCO <sub>3</sub>	: pour 1 litre	: pour 5 litres
:	:	:	:
:	à 5,6 %	: 15 ml	: 75 ml
:	:	:	:
:	HCO <sub>3</sub>	:	:
:	:	:	:
:	à 7,5 %	: 12 ml	: 60 ml
:	:	:	:

- Stériliser par filtration sur filtres Millipore 0,22 µ.
- Ajouter les antibiotiques.

#### 5.2. préparation du milieu complet

Au moment de l'emploi, ajouter :

- . 10 % de sérum de veau nouveau-né décomplémenté (chauffé à 52° C pendant 20 mn) ou foetal.
- . quelques gouttes d'une solution stérile d'HCl à 1 %, jusqu'à virage du milieu du rose au jaune-orangé.  
(ces ajouts sont pratiqués avec filtration à 0,22 µ).

## II - PREPARATION DES SOLUTIONS D'EXTRAITS A TESTER

Les cultures de Fusarium moniliforme sur riz ou sur maïs en grain subissent des extractions aqueuses strictes ou hydro-alcooliques. Ces deux types d'extraits bruts sont susceptibles de subir ensuite des partitions entre différents solvants, donnant alors naissance à des fractions plus ou moins solubles dans l'eau.

### 1 - Les extraits aqueux bruts

Ils sont testés sous plusieurs dilutions séries :

- \* 1000, 500 et 250 µg/ml de milieu de culture ;
- \* 100, 50 et 10 µg/ml de milieu si les concentrations plus fortes provoquent une forte inhibition de croissance.

Il est pesé 100 mg d'extrait brut (poids sec après évaporation) qui sont dissouts stérilement dans 10 ml d'eau distillée, ce qui donne une solution-mère à 10.000 µg/ml. Cette solution-mère subit stérilement des dilutions séries de sorte à obtenir les différentes solutions à tester :

dilution de la solution précédente	:	concentration des inoculats (µg/ml)	:	concentration dans le milieu de culture (µg/ml)
1/1	:	10.000	:	1.000
1/2	:	5.000	:	500
1/2	:	2.500	:	250
1/1	:	10.000	:	1.000
1/10	:	1.000	:	100
1/2	:	500	:	50
1/5	:	100	:	10

### 2 - Les extraits préparés avec un solvant organique

Leur mise en solution dans l'eau distillée est facilitée par l'emploi d'Ethanol ou de DMSO, de sorte à obtenir une solution ou une suspension fine qui soit homogène.

Il est pesé 10 mg d'extrait auxquels on ajoute 0,2 ml d'éthanol ou 0,4 ml de DMSO pour amorcer la solution sous agitation. On complète stérilement à 10 ml avec de l'eau distillée.

Des dilutions à 1000, 500 et 100 µg/ml sont ensuite effectuées.

Les plus fortes concentrations ne sont testées que si elles permettent l'obtention de solutions ou de suspensions stables.

### 3 - Incorporation des solutions à tester

Dans chaque cupule il est incorporé 0,1 ml de solution , qui sont convertis pour l'expression des résultats en éq.g de la culture ayant subi l'extraction (poids sec).

Parallèlement, les cupules témoin-négatif reçoivent 0,1 ml d'eau distillée stérile ; les concentrations utilisées d'éthanol ou de DMSO ne nécessitent pas la réalisation de témoins particuliers.

## III - CULTURE DES CELLULES VERO

### 1 - Mise en culture à partir d'un tube de cellules congelées

- . le tube contenant les cellules congelées est placé au bain-marie à 37°C.
- . après décongélation (environ 2 mn) le contenu du tube est versé dans une boîte pour culture (boîte FALCON 3024).
- . ajouter à la boîte environ 30 ml de milieu complet, agiter.
- . placer la boîte à l'étuve à 37°C après avoir reporté les indications du tube (nom de la souche, numéro).
- . ne pas manipuler la boîte avant 24 heures.
- . après 24 h, les cellules vivantes sont collées sur le fond de la boîte, les cellules mortes sont en suspension ; jeter le milieu et le remplacer par 30 ml de milieu neuf, après deux rinçages successifs par 20 ml de P.B.S.
- . au bout de 3 jours, le tapis cellulaire recouvre le fond de la boîte.
- . on peut alors faire une trypsination d'entretien et répartir en plusieurs boîtes.

### 2 - Culture des cellules VERO en boîtes

Les cellules sont cultivées dans des boîtes stériles à usage unique de tailles différentes en fonction des besoins de l'expérimentation :

- grande : FALCON 3028 : 75ml de milieu.
- moyenne : FALCON 3024 : 30 ml de milieu.
- petite : FALCON 3013F : 10 ml de milieu.

Dans tous les cas, les boîtes sont inoculées avec une suspension cellulaire à 200.000 cellules par ml de milieu ; un changement de milieu est pratiqué le lendemain. Le tapis cellulaire atteint la confluence au 4ème jour (voir trypsination d'entretien).

### 3 - Trypsination d'entretien

#### 3.1. trypsination sur place

##### 3.1.1. Principe :

La trypsination sur place tout comme la trypsination proprement dite permet de relancer une culture cellulaire sans utiliser la centrifugation.

### 3.1.2. Matériel :

- Tampon PBS + antibiotiques (sans Ca et Mg)
- Versénate de Na à 1/5000 (VERSENE-BioMérieux)
- Trypsine à 0,25 %
- Milieu de culture + antibiotiques
- Matériel de verrerie stérile
- Pipettes à usage unique

### 3.1.3. Manipulation :

- Rincer les cultures 3 fois au PBS
- Eliminer le PBS entre chaque rinçage
- Laisser agir le versène 5 à 10 mn à température ambiante
- Rejeter le versène
- Remplacer le versène par un égal volume de trypsine et laisser agir 5 minutes à 37°C
- Rejeter la trypsine sans décoller le tapis cellulaire
- Reprendre quelques millilitres du milieu à utiliser pour la culture et mettre les cellules en suspension par pipetage
- Compléter au volume désiré et incubé à 37°C.

Remarque : - Si les  $\emptyset$  se décollent poursuivre la manipulation en centrifugation.  
- Tous les réactifs sont à incuber à 37°C avant manipulation.

## 3.2. trypsination avec centrifugation

### 3.2.1. Principe :

Associée à un changement de milieu, la trypsination assure l'isolement cellulaire et permet de relancer une culture, de concentration cellulaire choisie.

### 3.2.2. Matériel :

- Tampon PBS + antibiotiques (sans Ca et Mg)
- Versénate de Na (EDTA) à 1/5000 (VERSENE-BioMérieux)
- Trypsine à 0,25 %
- Milieu de culture (MEM, stocker...) + PSKF
  - P : Pénicilline
  - S : Streptomycine
  - K : Kanamycine
  - F : Fongizone
- Sérum de veau foetal (SVF) ou de veau nouveau-né
- Matériel de verrerie stérile
- Pipettes à usage unique + propipettes
- Tubes plastiques.

### 3.2.3. Manipulation :

- Rincer les boîtes de culture au PBS (3fois)
  - . petite boîte (FALCON 3013F) 5 ml
  - . boîte moyenne (FALCON 3024) 20 ml
  - . grande boîte (FALCON 3028) 50 ml
- Après chaque rinçage, rejeter le PBS
- Faire agir le versène 5 à 10 mn à température ambiante
  - . petite boîte 5 ml
  - . boîte moyenne 5 à 10 ml
  - . grande boîte 15 à 20 ml

- Après le contact, rejeter le versène en s'assurant de la présence du tapis cellulaire.

Remarque : . Si les cellules commencent à se décoller, ajouter un égal volume de trypsine sans éliminer le versène.

- . Si les cellules sont isolées, ne pas trypsiner.

- Remplacer le versène par un égal volume de trypsine.
- Laisser en contact 5 à 15 mn à température 37° jusqu'à obtention d'une suspension cellulaire ; l'homogénéiser puis pipeter.
- Recueillir la suspension dans un tube à centrifuger stérile et centrifuger 10 mn à 2000 t/mn.
- Rejeter le surnageant et reprendre le culot par un volume précis du milieu à utiliser (MEM).
- Mettre les cellules en suspension homogène, les répartir par boîte à raison de 200.000 Ø par ml de milieu.
  - . petite boîte 10 ml
  - . boîte moyenne 30 ml      dont 7 à 10 % de SVF
  - . grande boîte 75 ml

Remarque : Tous les réactifs sont à incuber à 37°C avant la manipulation.

#### 4 - Conservation de la banque : mise en congélation des cellules

La mise en conservation doit se faire sur des cellules jeunes en multiplication (48 h à 72 h de culture).

- . Rincer 3 fois la culture avec du PBS sans calcium ni magnésium.
- . Traiter au Versène au 1/5000 pendant 10 mn.
- . Rejeter le Versène et le remplacer par un volume égal de trypsine à 0,25 % (si le tapis est décollé, ajouter la trypsine au Versène).
- . Laisser agir la trypsine pendant 15 à 30 mn et décoller les cellules par pipetage.
- . Centrifuger à 1500 t/mn pendant 10 mn.
- . Reprendre le culot dans du MEM et faire une numération de façon à obtenir 2 à 5 x 10<sup>6</sup> cellules/ml dans le volume final.
- . Ajouter 10 % de glycérol (ou DMSO) et 20 % de SVF.
- . Distribuer en ampoules, que l'on scelle à la flamme, à raison de 1 ml de suspension cellulaire par ampoule.
- . Mise en conservation : 2 techniques :
  - \* les ampoules sont enveloppées de coton hydrophile et placées dans une boîte de polystyrène à -70°C.
  - \* les ampoules sont placées successivement :
    - 1 h à +4°C
    - 1 à 2 h à -20°C (jusqu'à congélation)
    - à -70°C pour conservation
    - mises à l'azote après quelques heures à -70°C (si possible).

Remarque : Il est souhaitable de mettre en conservation chaque lot de cellules à la fois au congélateur à -70°C et sous azote liquide.

## 5 - Numération cellulaire

La numération des cellules est pratiquée avec un hématimètre de MALASSEZ.

### 5.1. numération sans coloration

- Diluer la suspension des cellules si la concentration est trop forte. Les résultats des numérations devront être réajustés selon cette dilution.
- Mettre le bout de la pipette remplie en contact avec l'hématimètre recouvert d'une lamelle de verre et laisser la suspension cellulaire s'étaler toute seule sous la lamelle par capillarité. Refaire l'opération s'il y a apparition de bulles d'air sous la lamelle.
- Laisser sédimenter les cellules pendant 2-5 minutes avant de les compter.
- L'hématimètre de Malassez a une cuve de  $1 \text{ mm}^3$  ; la surface du fond est quadrillée en 100 rectangles de  $1/20$  de  $\text{mm}^2$  dont 25 sont subdivisés en 20 petits carrés. Compter les cellules trouvées sur 5 rectangles pris au hasard et multiplier ce nombre par 20.000 pour avoir le nombre de cellules par millimètre.
- Calculer le nombre réel de cellules par ml en fonction des dilutions effectuées.

### 5.2. numération des noyaux cellulaires

Lorsqu'il y a des amas de cellules dans la suspension, on colore les noyaux pour faciliter la numération :

- agiter par intermittence pendant 15 minutes un mélange de 0,5 ml de suspension cellulaire et 0,5 ml d'une solution de violet hexaméthylé (violet cristallisé RAL 0,1 g, acide citrique cristallisé 3,85 g, eau déminéralisée 100 ml).
- effectuer la numération comme pour les cellules, en tenant compte des dilutions préalables.

### 5.3. numération des cellules vivantes

- Mélanger 0,5 ml d'une suspension cellulaire avec 0,5 ml d'une solution de colorant vital (Trypan bleu à 0,5 % ou Eosine à 1 % dans le P.B.S.).
- Compter les cellules vivantes qui restent incolores pendant une quinzaine de minutes.

## IV - REALISATION DU TEST

Il consiste à déterminer la concentration d'extrait inhibant de 50 % la croissance des cellules ; c'est la DI 50 (dose inhibitrice à 50 %).

La croissance cellulaire est évaluée visuellement à l'aide d'un microscope inversé, les cellules étant cultivées en plaques à 24 cupules de 1 ml (FALCON 3008 Multiwell).

## 1 - Déroulement du test : protocole n° 1

Il se déroule sur 4 jours.

### 1.1. jour j -1 (mercredi)

Les cellules alors cultivées en boîte subissent un changement de milieu, de sorte à avoir une activité métabolique optimale le lendemain.

### 1.2. jour j 0 (jeudi)

Les tapis cellulaires dans les boîtes de culture atteignent la confluence.

Après trypsination et numération cellulaire, il est établi une suspension à 200.000 cellules par ml de milieu.

Les cellules sont réparties dans les cupules à raison de 1 ml de suspension par cupule, puis les plaques sont placées en étuve à 37°C pendant 24 heures sans manipulation.

Les cellules se développent alors sur le fond plat des cupules.

### 1.3. jour j 1 (vendredi)

Le milieu de culture est rejeté, par retournement de la plaque et tamponnement sur du papier absorbant stérile.

Chaque cupule reçoit alors 0,9 ml de MEM à 10 % de sérum de veau nouveau-né décomplémenté et 100 µl d'extrait à tester ou de liquide-témoin distribués à la pipette PIPETMAN.

La plaque est ensuite agitée horizontalement pour homogénéiser la répartition des extraits dans chaque cupule.

#### 1.3.1. Cupules d'essai :

- 900 µl de milieu complet
- 100 µl de solution d'extrait

On utilise 3 cupules par dilution de chaque extrait.

#### 1.3.2. Cupules témoin-substrat :

Le substrat de culture du champignon (riz ou maïs en grain) est autoclavé et subit la même extraction que les cultures mycéliennes.

L'extrait est alors dilué dans l'eau distillée de sorte à obtenir les mêmes concentrations, exprimées en éq.g/ml de maïs ou de riz que les extraits fusariens à tester.

On utilise deux cupules par dilution de cet extrait.

Ces cupules reçoivent :

- 900 µl de milieu complet
- 100 µl d'extrait de substrat.



### 1.3.3. Cupules témoin-cellules :

Elles reçoivent :

- 900 µl de milieu complet.
- 100 µl d'eau distillée stérile.

On utilise une cupule par ligne de la plaque, de sorte à faciliter ensuite la lecture qui s'effectue ligne par ligne.

	1	2	3	4	5	6	
A							concentration 1
B							concentration 1/2
C							concentration 1/5
D							concentration 1/10
	témoins cellules	témoins	substrat	extrait			

### 1.4. jours j 2 et j 3

Si possible, contrôle visuel rapide en contraste de phase.

### 1.5. jour j 4 (lundi)

Lecture finale si les cultures, dans les cupules témoin-cellules, atteignent la confluence.

Dans le cas contraire, la durée du test est prolongée jusqu'à la confluence effective dans les cupules.

## 2 - Déroulement du test : protocole n° 2

Il s'agit d'une simplification du protocole n° 1 :

- jour j -1 : les cellules alors cultivées en boîte subissent un changement de milieu, de sorte à avoir une activité métabolique optimale le lendemain.
- jour j 0 : les cupules reçoivent 100 µl de solution d'extrait fusarien ou d'extrait de substrat ou d'eau distillée selon le même plan, puis 1 ml de suspension cellulaire à 200.000 cellules par ml.
- jour j 1, j 2 et j 3 : aucune manipulation.
- jour j 4 : lecture du test si confluence dans les cupules témoins.

## **2.1. avantages de ce protocole**

- simplicité de manipulation ;
- mise en place des extraits avant celle des cellules.
- résultats comparables à ceux du protocole n° 1.

## **2.2. inconvénients de ce protocole**

- absence de changement de milieu de culture ;
- impossibilité de contrôle en cours de test (j 2 et j 3) de par la présence d'abondants déchets de culture.
- dépôt total de 1,1 ml par cupule, d'où une dilution de 10 % des quantités d'extrait testées.

## **3 - Lecture du test**

### **3.1. rinçage des tapis cellulaires**

Au jour final, toutes les cupules sont vidées de leur milieu et la plaque est posée en position inversée sur du papier absorbant (la stérilité n'est plus requise).

Puis les tapis cellulaires sont rincés avec du MEM sans sérum (1 ml par cupule) qui est ensuite évacué.

Second séchage sur papier absorbant.

### **3.2. fixation des tapis cellulaires**

A ce stade ne subsistent que les cellules vivantes qui adhèrent au fond des cupules.

Elles sont fixées au formol aqueux isotonique à 3,7 % (1 ml par cupule).

Le formol est évacué après 30 mn au moins.

Séchage sur papier absorbant.

### **3.3. coloration des tapis cellulaires**

#### **3.3.1. Coloration au GIEMSA R. :**

Les cupules reçoivent 1 ml d'une solution de GIEMSA R (2 gouttes par ml d'eau distillée).

Le colorant est évacué après 30 mn puis les cupules sont rincées à l'eau et séchées en étuve.

Malgré l'absence de montage, ces préparations se conservent assez bien.

### 3.3.2. Coloration à l'hémalun-éosine :

(Hémalun de MAYER ; éosine à 1 % dans l'eau distillée)

- 1 ml d'hémalun par cupule ; 10 mn.
- rinçage à l'eau.
- différenciation à l'eau lithinée (carbonate de lithium à saturation dans l'eau).
- rinçage à l'eau.
- 1 ml d'éosine par cupule ; 5 mn.
- rinçage à l'eau.
- séchage en étuve.

## 3.4. lecture

### 3.4.1. Lecture au microscope inversé :

On utilise l'objectif 20.

Une évaluation précise de la densité cellulaire (nombre de cellules par unité de surface) est impossible car :

Cependant, la comparaison des densités cellulaires entre cupules d'essai et cupules témoin est possible, par évaluation des espaces libres entre les cellules.

La lecture de la plaque est faite ligne par ligne et, pour chaque cupule, selon leurs diamètres horizontal et vertical. Elle a pour but :

- de vérifier l'homogénéité de la densité cellulaire dans les cupules témoin-cellules nécessaire à la validité des résultats ;
- de vérifier l'absence d'inhibition dans les cupules témoin-substrat ;
- de vérifier l'identité des réponses dans les 3 cupules d'essai d'une même dilution d'extrait ;
- d'estimer le degré d'inhibition de croissance cellulaire dans ces cupules .

## INHIBITION DE CROISSANCE DE CELLULES VERO = RESULTATS

L'activité cytotoxique (inhibition de croissance cellulaire) d'extraits de culture de la souche 68R sur maïs a été prospectée de sorte à doubler ou remplacer, en matière de test non spécifique mais très sensible, l'administration intrapéritonéale au rat de 20 jours.

Cette dernière pose, en effet, des problèmes matériels =

- faible approvisionnement en rats ;
- réception d'un lot par 15 jours qui, alliée à la perte de sensibilité des rats au-delà de 26-28 jours, oblige à grouper les tests et crée ainsi des ruptures dans l'organisation du travail ;
- consommation modérée d'extraits, mais qui ne sera plus supportable au-delà d'un certain progrès dans la purification chimique.

Les efforts actuels tendent donc à mettre au point un test sur cultures de cellules et à le corréliser avec le test intrapéritonéal chez le rat qui est notre référence.

Pour ce faire, la souche cellulaire VERO (lignée continue) a été retenue puisqu'elle est immédiatement disponible sur le territoire.

Les premières expériences ont été conduites en =

- une série de cellules cultivées en tubes ;
- trois séries de cellules cultivées en plaques de 24 cupules.

Elles montrent que les extraits aqueux de culture fusarienne sur riz (souche 68R) inhibent fortement la croissance des cellules VERO, avec un effet-dose assez net. Les résultats sont reproductibles. La méthode en cupules est définitivement retenue, puisqu'elle offre tous les avantages souhaités =

- culture sur fond plan, ce qui permet ensuite une lecture visuelle facile au microscope.
- juxtaposition de 24 cupules, assurant des conditions culturelles tout à fait comparables entre cupules-témoin et cupules d'essai, et permettant leur comparaison immédiate lors de la lecture ;
- différences macroscopiquement visibles en fin de test entre les cupules ayant subi une inhibition et les autres (différence d'intensité de couleur ; trous dans le tapis cellulaire).

## 1/ Résultats des 4 premières séries

### a) - série n°1 en tubes :

Elle a mis en évidence l'action inhibitrice de l'extrait aqueux d'une culture de la souche 68R sur riz, mais sans permettre sa quantification ou son évaluation.

### b) - séries n° 2, 3 et 4 en cupules :

Elles ont été pratiquées avec des plaques FALCON 3008 multiwell ; les concentrations testées d'extrait 68R aqueux étaient de 632, 316 et 158  $\mu\text{g/ml}$  de milieu de culture

L'extrait total hydroalcoolique d'une culture de la souche 68R sur riz a été testé également, aux concentrations de 526,263, 131 $\frac{1}{4}$  et 65  $\frac{3}{4}$   $\mu\text{g/ml}$  de milieu.

Ces tests ont été conduits selon les protocoles n° 1 et 2 décrits plus haut ; les résultats sont =

- quant aux protocoles : une inhibition très supérieure est constatée avec le protocole n°1, ce qui rend la visualisation plus facile, mais ne permet pas de reconnaître un effet-dose. On doit admettre que la sensibilité cellulaire est très augmentée par ce protocole.
- quant à l'effet d'inhibition : il se manifeste par l'apparition d'un trou central dans le tapis cellulaire, qui est d'autant plus vaste que la concentration d'extrait augmente ; cet aspect morphologique très facilement visualisé est inexpliqué, si ce n'est par une mauvaise répartition des extraits dans les cupules. La validité du test serait donc compromise ; cependant les résultats sont reproduits fidèlement dans les 3 séries d'essais.
- quant à l'activité inhibitrice des extraits (protocole n°2) : les résultats sont les suivants =

Série	Protocole	Extrait	Dose (µg/ml)	Diamètre moyen du trou central (mm)	Pourcentage de surface acellulaire
3	2		526	1-2 mm	1,50 %
		68R	263	0	0
		total	131 $\frac{1}{2}$	0	0
			65 $\frac{3}{4}$	0	0
			632	12 mm	56,25 %
		68R	316	9	31,65 %
		aqueux	158	6	14,10 %
	1		526	5 mm	9,75 %
		68R	263	2 mm	1,50 %
		total	131 $\frac{1}{2}$	0	0
			65 $\frac{3}{4}$	0	0
			632	15 mm	95 %
		68R	316	12	56,25 %
		aqueux	158	6	14,10 %

Série	Protocole	Extrait	Dose (µg/ml)	Diamètre moyen du trou central (mm)	Pourcentage de sur- face acellulaire
4	1		526	5 mm	9,75 %
		68R	263	2	1,50 %
		total	131 $\frac{1}{2}$	0	0
			65 $\frac{3}{4}$	0	0
			632	16 mm	100 %
		68R	316	12	56,25 %
		aqueux	158	6	14,10 %
	2		526	0	0
		68R	263	0	0
		total	131 $\frac{1}{2}$	0	0
			65 $\frac{3}{4}$	0	0
			632	13	66 %
		68R	316	11	47,25 %
		aqueux	158	2	1,50 %

Les résultats obtenus sont donc relativement reproductibles, et attestent de l'activité cytotoxique des extraits de culture de la souche 68R.

La morphologie de l'effet inhibiteur, suspecte, est attribuée à un effet de bordure dans les cupules; 3 voies d'investigation sont décidées =

- cultures en boîtes de Terasaki pour réduire cet effet de bordure ;
- culture en plaques à 24 cupules FALCON 3047, dotées d'un revêtement interne particulier, dans le même but ;
- dosage des protéines cellulaires en fin de test, de sorte à le quantifier.

## 2/ Résultats des séries 5 à 8

### a) - série 5 = boîtes de Terasaki :

L'inhibition de croissance est retrouvée avec les mêmes concentrations d'extraits ; elle se manifeste par un appauvrissement homogène des tapis cellulaires par rapport aux témoins. Cette procédure est donc utilisable.

### b) - séries 6,7,8 = plaques FALCON 3047 :

Les résultats sont également retrouvés, l'inhibition se manifestant par un appauvrissement homogène des tapis cellulaires. On l'évalue en estimant visuellement au microscope, après coloration, la surface des espaces intercellulaires par rapport aux surfaces colonisées, dans 5 champs du microscope. L'effet inhibiteur de l'extrait aqueux est :

632 <del>µg</del> g/ml	= très net
316 <del>µg</del> g/ml	= net
158 <del>µg</del> g/ml	= perceptible

Les tapis cellulaires dans les cupules témoin sont confluent.

### c) - séries 6,7,8 = dosage des protéines :

Il est réalisé au moyen du Protéine-Kit BioMérieux qui exploite une réaction de type biuret ; la lecture s'effectue à 545 nm, en comparaison à un blanc réactif et un étalon d'albumine sérique bovine.

Les 4 fiches de résultats qui suivent indiquent une proportionnalité entre l'inhibition et la concentration d'extrait ; il y a effet-dose, mais la reproductibilité des résultats est médiocre. Dans l'impossibilité de l'améliorer nous nous en contentons.

Cette manipulation permet de relier les aspects morphologiques observés à des valeurs chiffrées ; les lectures ultérieures sont strictement visuelles.

Il est décidé d'éprouver des fractions de l'extrait aqueux selon ce protocole.

# TOXICITE SUR CELLULES VERO (Série 5)

Plaque n° : B1

date : 19/09/86

souche : 68R

extrait : surnatant total

TABLEAU DES D.O.

	1	2	3	4	5	6
A	x 0,012	x 0,010	0,016	0,016	0,015	0,022
B	x 0,008	0,009	0,013	0,014	0,016	0,021
C	x 0,012	0,009	0,010	0,014	0,016	0,016
D	x 0,012	0,020	0,021	0,020	0,022	0,023

D.O. étalon = 0,500

TABLEAU DES CONCENTRATIONS PROTEIQUES (mg/ml)

	1	2	3	4	5	6
A						
B						
C						
D						

$\frac{\text{D.O. dosage}}{\text{D.O. étalon}} \times (\text{Protéitrol } 100 \text{ mg/ml})$

D.O. témoin = 0,2175

	1	2	3	4	5	6
dilution	10	5	2,5	1	0,5	Tox
D.O. moyenne (x 100)	19,66	9,66	13,00	14,66	15,66	21,75
taux de croissance	49,04	42,91	59,77	67,43	72,03	100
taux d'inhibition	50,96	57,09	40,23	32,57	27,97	0

$\frac{\text{D.O. dilution d.}}{\text{D.O. témoin}} \times 100$

?



# TOXICITE SUR CELLULES VERO (Série 5)

Plaque n° : B2

date : 19/09/86

souche : 68R

extrait : aqueux total

TABEAU DES D.O.

	1	2	3	4	5	6
A	0,008	0,010	0,011	0,016	0,012	0,016
B	0,006	0,011	0,012	0,014	0,011	0,014
C	0,009	0,008	0,011	0,014	0,015	0,017
D	0,019	0,011	0,013	0,017	0,014	0,014

D.O. étalon = 0,500

TABEAU DES CONCENTRATIONS PROTEIQUES (mg/ml)

	1	2	3	4	5	6
A						
B						
C						
D						

$\frac{\text{D.O. dosage}}{\text{D.O. étalon}} \times (\text{Protéitrol})$   
100 mg/ml

D.O. témoin = 0,1525

	1	2	3	4	5	6
dilution	5	2,5	1	0,5	0,1	Ex
D.O. moyenne (x 100)	7,66	9,66	11,33	14,66	12,66	15,25
taux de croissance	59,22	63,34	74,29	96,13	83,01	100
taux d'inhibition	49,78	36,66	25,71	3,87	16,99	0

$\frac{\text{D.O. dilution d.}}{\text{D.O. témoin}} \times 100$

# TOXICITE SUR CELLULES VERO (Série 6)

Plaque n° : A<sub>2</sub>

date : 25/09/86.

souche : 68R.

extrait : aqueux.

TABEAU DES D.O.

	1	2	3	4	5	6
A	0,010	0,013	0,017	0,019	0,023	0,019
B	0,013	0,011	0,014	0,019	0,025	0,028
C	0,011	0,014	0,014	0,019	0,018	0,025
D	0,025	0,022	0,024	0,026	0,023	0,023

TABEAU DES CONCENTRATIONS PROTEIQUES (mg/ml)

	1	2	3	4	5	6
A						
B						
C						
D						

$$\frac{\text{D.O. dosage}}{\text{D.O. étalon}} \times (\text{Protéitrol})$$

D.O. = 0,498

D.O. témoin = 0,024

	1	2	3	4	5	6
dilution	10	5	2,5	1	0,5	Tox
D.O. moyenne (x100)	11,33	12,66	16	19	22	24
taux de croissance %	47,20	52,77	66,66	79,16	91,66	100
taux d'inhibition %	52,80	47,23	33,34	20,84	8,34	0

$$\left( \frac{\text{D.O. témoin}}{\text{D.O. dilution d.}} \right)^{-1} \times 100$$

# TOXICITE SUR CELLULES VERO (Série 6)

Plaque n° : A3

date : 25/09/86.

souche : 68R

extrait : aqueux

TABLEAU DES D.O.

	1	2	3	4	5	6
A	0,013	0,016	0,016	0,019	0,021	0,022
B	0,014	0,015	0,021	0,017	0,019	0,017
C	0,013	0,014	0,016	0,020	0,019	0,019
D	0,021	0,017	0,020	0,021	0,017	0,018

TABLEAU DES CONCENTRATIONS PROTEIQUES (mg/ml)

	1	2	3	4	5	6
A						
B						
C						
D						

$$\frac{\text{D.O. dosage}}{\text{D.O. étalon}} \times (\text{Protéitrol})$$

$$\text{D.O. étalon } 20 = 0,498$$

D.O. témoin = 0,01933

	1	2	3	4	5	6
dilution	2,5	1	0,5	0,1	T <sub>0</sub> 6	T <sub>0</sub> 8
D.O. moyenne (x 100)	13,33	15	17,66	18,66	19,66	19,33
taux de croissance %	68,97	77,59	91,39	96,53	101,70	100%
taux d'inhibition %	31,03	22,41	8,61	3,47	-1,70	0

$$\left( \frac{\text{D.O. témoin}}{\text{D.O. dilution d.}} \right)^{-1} \times 100$$

### 3/ Résultats des séries 9 et 10

L'extrait aqueux total 68R est testé à titre de témoin négatif, en comparaison aux fractions :

A = phase éthanolique issue du passage sur charbon actif.

B = dialysé supérieur à 1 000 de la phase aqueuse issue du passage sur charbon actif.

C = dialysat inférieur à 1 000 de la même phase aqueuse.

Les fractions A,B,C sont testées aux concentrations de 500, 250, 100, 50 et 10 µg/ml de milieu.

Les fractions A et B ne sont pas cytotoxiques ; la fraction C l'est :

- très nettement à 500, 250, 100 µg/ml.
- faiblement à 50 µg/ml.
- non cytotoxique à 10 µg/ml.

NOTE : Le dialysé supérieur à 1000 de la phase aqueuse issue du passage sur charbon actif a montré qu'il était toxique pour les rats par voie péritonéale et non toxique par voie oesophagienne.

Dans le test cytologique précédent, il est non toxique sur une culture de cellules VERO.

Le dialysat inférieur à 1000 de la même phase aqueuse s'est révélé toxique pour le rat par voie péritonéale, et faiblement toxique par voie oesophagienne, sa cytotoxicité, en confirmant ces résultats est encourageante.

REPRODUCTION EXPERIMENTALE  
DE LA LEUCOENCEPHALOMALACIE  
EQUINE : PROTOCOLE D'ESSAI

## I - PROVENANCE DES ANIMAUX

Les animaux utilisés pour l'expérimentation sont des chevaux des deux sexes, d'âge adulte, de "race locale", achetés sur le marché de la boucherie.

Ils sont achetés en fonction de l'offre, mais volontairement choisis d'âges différents, ce critère ayant été reconnu comme influant sur la durée nécessaire d'intoxication (BADIALI - 1968).

## II - RECEPTION ET PREPARATION DES ANIMAUX

### 1 - Réception :

A leur réception, les animaux sont pesés et vermifugés (Telmin + Trichlorfon ND) après qu'un examen coproscopique ait été pratiqué ; ils subissent un examen clinique simple des grandes fonctions.

Ils sont ensuite entretenus à l'herbe durant trois semaines au moins, de sorte à effacer les aléats liés aux conditions antérieures d'entretien et au transport.

### 2 - Préparation :

La semaine précédant leur entrée en expérimentation, les animaux sont mis en enclos, pesés, et subissent un examen clinique ; un bilan complet hématologique et biochimique est pratiqué ; ainsi qu'un examen coproscopique de contrôle.

- 2.1 - hématologie :
- . numération des globules blancs et rouges
  - . formule leucocytaire
  - . taux d'hémoglobine
  - . hématocrite
  - . volume globulaire moyen
  - . TGMH
  - . CGMH

- 2.2 - biochimie sanguine :
- . urée - créatinine
  - . protéines totales (dosage)
  - . protéines (électrophorèse)
  - . albumine
  - . SGOT - SGPT - ALP
  - . GGT - OCT - SDH - CPK
  - . bilirubine totale et conjuguée
  - . calcium et phosphore
  - . temps de QUICK
  - . ammoniacque

Sont explorées ainsi les fonctions hépatique, rénale, et musculaire.

## 2.3 - biochimie urinaire : étude par bandelettes réactives MULTITEST-S (AMES) :

- |                    |                 |
|--------------------|-----------------|
| . pH               | . sang          |
| . glucose          | . bilirubine    |
| . corps cétoniques | . urobilinogène |
| . nitrites         | . protéines     |

Cette étude est complétée par un examen physique et, si nécessaire, par un examen microscopique du culot de centrifugation.

## 2.4 - alimentation :

Au plan de la ration, les animaux reçoivent un aliment complet en farine, à dose progressivement croissante, ainsi que du fourrage vert à volonté.

### 2.4.1 - aliment complet :

* composition :	. maïs grain	45	%
	. soja	26,5	%
	. son	20	%
	. Na Cl	1	%
	. Ca CO <sub>3</sub>	2,5	%
	. Bicalcique	0,5	%
	. Mélasse	4	%
	. Prémix	0,5	%

soit un aliment à 0,92 UF et 183 g de MAD par kilo, avec 3 % de cellulose brute, 11 g de Calcium et 6,5 g de Phosphore.

- \* rationnement : . 1 kg/j de j -7 à j -4
- . 2 kg/j de j -3 à j -1
- . 3 kg/j ensuite.

### 2.4.2 - fourrage vert :

- \* nature : maïs vert avant floraison coupé chaque jour.
- \* rationnement : 40 kg/j, avec pesée des refus le lendemain.

## III - MISE EN EXPERIMENTATION DES ANIMAUX

### 1 - Administration du produit :

#### 1.1 - nature du produit administré :

Le produit administré est un extrait aqueux obtenu à partir de cultures de Fusarium moniliforme (souche 68 R) sur maïs en grain autoclavé.

La culture et l'extraction sont conduites selon nos procédures habituelles. L'extrait issu de chaque culture est préalablement testé :

- par voie orale chez le rat de 20 jours ; il doit entraîner la mort des rats en 5 à 7 jours à la dose quotidienne de 7,5 éq.g de maïs par rat ;
- par voie péritonéale chez le rat de 20 jours ; il doit entraîner la mort des rats dans l'heure qui suit une injection de 7,5 éq.g de maïs par rat.

## 1.2 - mode et rythme d'administration :

Le produit est administré quotidiennement par sondage naso-oesophagien.

Après l'administration de l'extrait, un volume de 500 ml d'eau est administré de sorte à laver la sonde et à assurer l'ingestion complète de la dose.

## 1.3 - dose quotidienne administrée :

Les seules reproductions expérimentales de L.E.M. rapportées chez le cheval ont été conduites avec du maïs en grain artificiellement contaminé. Les doses quotidiennes rapportées sont de 2,5 et 5 g de maïs par kg de poids vif (MARASAS et Al. 1976 ; KRIEK et Al. 1981).

De telles doses ont souvent perturbé les expérimentations en induisant des fourbures aiguës avant l'apparition des premiers signes de L.E.M. Ceci justifie notre choix d'un extrait aqueux administré à la dose de 5 éq.g de maïs contaminé par kilogramme de poids vif.

Cette dose initialement prévue peut être diminuée en cours d'expérience en fonction des modifications cliniques et biochimiques constatées. On sait en effet qu'une dose trop forte peut entraîner des troubles hépatiques fatals sans que les symptômes et lésions nerveuses pathognomoniques aient pu s'installer (MARASAS et Al. 1976).

## 2 - Alimentation des animaux :

Les animaux sont nourris avec l'aliment complet décrit précédemment, qui couvre leur besoin d'entretien théorique et le maïs vert fourni à volonté.

## 3 - Suivi médical des animaux :

L'état de santé des animaux est suivi par le contrôle des facteurs suivants :

### 3.1 - consommation d'aliment : suivi quotidien.

### 3.2 - état général :

Suivi quotidien par un examen clinique complet des grandes fonctions (voir fiche d'examen clinique).

### 3.3 - hématologie ; biochimie sanguine et urinaire :

Les paramètres hématologiques et biochimiques cités précédemment sont explorés 3 fois par semaine (lundi - mercredi - vendredi), puis quotidiennement si des troubles cliniques apparaissent.

### 3.4 - fonctions nerveuses :

Un examen neurologique complet est conduit chaque jour à partir de j 0 et jusqu'au terme de l'expérience.

Cet examen respecte une procédure méthodique (voir fiche d'examen clinique) de sorte à mettre en évidence au plus tôt les déficits éventuels des différents segments nerveux.

#### IV - FIN DE L'EXPERIMENTATION

##### 1 - Expérience sans syptomatologie :

Pour chaque animal, l'expérimentation est limitée dans le temps par nos capacités faibles de culture du champignon : il n'est possible de contaminer simultanément qu'une masse de maïs correspondant à 10 ou 12 doses quotidiennes selon le poids du cheval.

Chaque expérience dure donc, au maximum, autant de jours qu'il y a de doses disponibles, auxquels s'ajoutent 15 jours d'observation clinique .

##### 2 - Expérience avec symptomatologie :

Dans le cas où une symptomatologie s'exprime, l'administration de l'extrait et le suivi médical du cheval sont poursuivis aussi longtemps que son état le permet.

L'animal est ensuite euthanasié et autopsié.

##### 3 - Euthanasie :

Elle est pratiquée par anesthésie au NESDONAL N.D. puis saignée carotidienne dès que l'état de l'animal est jugé dramatique (agressivité, perte de conscience, excitation) ou irréversible.

En cas d'impossibilité d'aborder l'animal, une injection intramusculaire préalable de ROMPUN N.D. (Xylasine) est pratiquée.

L'anesthésie de l'animal est mise à profit pour pratiquer un prélèvement de liquide céphalo-rachidien (examen physique, cytologique, biochimique).

##### 4 - Autopsie :

L'autopsie est conduite de façon systématique et exhaustive selon la technique habituellement respectée pour les grands animaux. Elle débute par l'examen morphologique du cerveau et du cervelet, en raison de leur grande vitesse d'autolyse et de leur importance majeure dans notre étude.

Les prélèvements en vue d'histologie sont réalisés au plus tôt au cours de l'autopsie et placés dans le formol isotonique à 10 %.

##### 5 - Prélèvements histologiques :

Sont systématiquement soumis à prélèvement :

- . cerveau (en totalité)
- . cervelet (en totalité)
- . bulbe rachidien
- . moëlle épinière : cervicale - thoracique - lombaire
- . foie et reins
- . rate et pancréas
- . tous segments digestifs
- . coeur, aorte thoracique et abdominale
- . poumons et trachée
- . un muscle squelettique
- . les nerfs sciatiques

ainsi que tout organe macroscopiquement lésé.

Une étude histologique est pratiquée sur tous ces organes selon la technique de routine (inclusion en paraffine, coloration H.E.S.) complétée par toute coloration spéciale jugée utile.



# COMPT E - R E N D U   C L I N I Q U E

---

(Jument n° 1)

21 Août 1986

L'état de santé de la jument est suivi en continu par :

- examen physique quotidien
- contrôle quotidien de la consommation alimentaire
- biochimie urinaire
- biochimie sanguine                   :           3 fois par semaine
- hématologie                           :

Ces différents points sont rapportés séparément puis une synthèse globale permet de suivre l'évolution clinique de l'animal.

## I - EXAMEN PHYSIQUE

(voir tableau n° XV)

Aucun signe clinique n'est noté entre j 0 et j 3.

A j 4, on note : . une hyperthermie modérée qui se maintient jusqu'au dernier jour ;  
                  . une élévation modérée du rythme cardiaque qui s'accroît à j 5, puis régresse ;  
                  . une accentuation modérée de la couleur jaune habituelle des muqueuses oculaires, gingivales et vulvaires ; on peut parler de subictère.

A j 5 une petite diarrhée est notée ; l'auscultation révèle de forts borborigmes d'origine caecale et colique ; ce trouble digestif régresse dès le lendemain. Au plan locomoteur, un très léger déficit des postérieurs est noté, qui est attribué à la présence de pierres sous la sole postérieure droite.

A j 7 et j 8, l'animal a retrouvé son état de santé originel.

A j 9, l'hyperthermie et le sondage urinaire permettent de diagnostiquer une cystite imputable aux prélèvements répétés d'urine. Aucun traitement n'est envisagé. La tachycardie modérée constatée à j 10 est attribuée à la fièvre associée à cette cystite.

A j 11, un ictère léger est constaté à l'examen des muqueuses ; il se maintient jusqu'au dernier jour ; l'analyse d'urine confirme cet ictère.

A j 13 est noté le premier signe pouvant exprimer une atteinte nerveuse : il s'agit d'un léger déficit au niveau des postérieurs (premier degré de parésie), tandis que la sensibilité et les réflexes sont conservés dans toutes les régions du corps.

A j 14 ce déficit locomoteur est accentué : spasticité du premier degré au niveau des quatre membres ; l'animal répugne à se déplacer et replace systématiquement son corps dans l'axe tête-encolure lorsqu'on lui dévie la tête. Il est faible et apathique ; ses muqueuses sont nettement jaunes et congestionnées. La tachycardie est importante.

La jument est retrouvée morte à j 15 ; la mort date de quelques heures.

#### Bilan :

L'examen physique permet de mettre en évidence chronologiquement :

- un épisode fugace de diarrhée à j 5, puis reprise à j 13 ;
- un ictère notable cliniquement dès j 11 et qui s'accroît à j 14 ;
- une tachycardie importante et terminale sans trouble associé du rythme ;
- des signes nerveux modérés et terminaux (j 13 - j 14).

On en retient que ces signes ne laissent pas supposer une mort aussi brutale. Par ailleurs, l'évidence d'une cystite pouvait expliquer certains de ces signes (hyperthermie, tachycardie, déficit des postérieurs).

## II - CONTROLE DE LA CONSOMMATION ALIMENTAIRE

Durant toute l'expérimentation la jument reçoit quotidiennement 15 kg de maïs vert avant floraison et de l'aliment complet :

- 1 kg/jour de j -7 à j -1 ;
- 2 kg/jour ensuite.

De j 0 à j 12, l'aliment complet est consommé en totalité mais le fourrage vert est progressivement délaissé (aucun refus à j 0 ; 20 % de refus à j 12).

A j 13 et j 14, la prise d'aliment est subitement réduite à zéro, coïncidant avec l'émergence des signes cliniques.

## III - BIOCHIMIE URINAIRE ; CYTOLOGIE URINAIRE

	j 2	j 4	j 7	j 9	j 11	j 14
couleur	jaune paille	jaune trouble	jaune paille trouble	foncée	foncée	jaune-brun
pH	9	8	9	9	9	5
glucose	-	-	-	-	-	-
corps cétonique	-	-	-	-	-	-
nitrites	-	-	-	-	+	-
sang/hémoglobine	-	-	-	50 ery/ul	50 ery/ul	250 ery/ul
bilirubine	-	-	normal	-	+	+
urobilinogène	normal	normal	normal	1 mg/dl	1-4 mg/dl	normal
protéines	±	-	30 mg/dl	30 mg/dl	100 - 500 mg/dl	500 mg/dl
cytologie	-	-	-	absence d'hématies	présence de polynucléaires neutrophiles, absence d'hématies.	

Les premières variations enregistrées dans l'analyse urinaire (j 7 - j 9) permettent le diagnostic de cystite. Un coliforme sensible à la spiramycine est isolé de l'urine de j 9 ; le traitement antibiotique local est mis en oeuvre à j 14.

A j 11 et j 14 la protéinurie devient très importante ; elle laisse supposer une atteinte rénale surajoutée à la cystite mais qui n'est pas confirmée par la biochimie sanguine, à j 11. A j 14 l'atteinte rénale est évidente.

La recherche de sang-hémoglobine est positive dès j 9 et très positive à j 14 ; l'absence d'hématies dans l'urine permet d'envisager qu'il s'agisse d'hémoglobinurie ou de myoglobinurie.

#### IV - BIOCHIMIE SANGUINE

(voir tableau n° XVI)

Le temps de Quick et l'albumine sérique conservent des valeurs normales durant toute l'expérience soulignant l'absence d'atteinte hépatique préexistante.

La bilirubinémie est marquée par un taux modérément augmenté de bilirubine totale à partir de j 7 qui croît ensuite progressivement pour atteindre une valeur très forte à j 14 ; ceci incombe surtout à la bilirubine libre et témoigne d'une atteinte hépatique croissante.

Parmi les enzymes sériques d'origine hépatique, les phosphatases alcalines (ALP) et la gamma-glutamyl transférase (GGT) ont aussi des taux croissant modérément et progressivement à partir de j 7. Les ALP sortent des valeurs normales dès j 7 ; leur taux est multiplié par 3 à j 14. La GGT subit une progression plus modérée.

SDH et OCT, autres enzymes d'origine hépatique, ont des taux sériques faiblement augmentés dès j 4 - j 7, mais conservent des valeurs modérées durant toute l'expérience ; ceci oriente vers une atteinte hépatique de type stéatose et/ou cholestase avec faible cytolyse hépatocytaire.

Par là-même, le taux extrêmement élevé de SGOT à j 14 pourrait témoigner d'une atteinte musculaire ou myocardique terminale (à rapprocher des taux de CPK).

Le taux d'ammoniaque sérique augmente à j 11 pour atteindre une valeur limite à j 14, et suit les mêmes variations que les enzymes hépatiques.

Le phosphore, l'urée et la créatinine atteignent des taux sériques très préoccupants témoignant d'une forte atteinte rénale terminale.

#### Bilan :

Les différents paramètres étudiés de biochimie sanguine atteignent des valeurs préoccupantes à j 14 qui imposent un pronostic sombre.

Dans les jours précédents, les valeurs sont toutes dans les limites admises, à l'exception des ALP ; leur intérêt diagnostic et pronostic est donc très faible dans notre étude. La SGPT s'avère notamment être un mauvais moyen d'investigation.

Par contre, leur étude rétrospective apporte des renseignements très intéressants :

- atteinte hépatique notable dès j 7, et croissante ensuite ; cette atteinte est de type dégénératif avec peu de nécrose hépatocytaire.
- insuffisance rénale terminale.

## V - HEMATOLOGIE

(voir tableau n° XVIII)

L'hématologie témoigne à partir de j 9 - j 11 d'une déshydratation croissante :

- élévation de l'hématocrite,
- élévation du nombre d'hématies,
- augmentation du taux sanguin d'hémoglobine,
- au plan biochimique : augmentation du taux sérique de protéines totales avec conservation des rapports entre les différentes fractions protéiques.

Abstraction faite de cette hémococoncentration, la numération érythrocytaire est à considérer comme stable.

A j 9 - j 11, la formule leucocytaire est marquée par une neutrophilie relative qui permet le diagnostic de cystite.

En tenant compte de cette neutrophilie, les leucocytes circulants totaux sont en diminution croissante à partir de j 7 ; l'étude des formules leucocytaires absolues met en évidence un déclin très net du nombre des lymphocytes et des granulocytes tout particulièrement neutrophiles.

La lymphopénie est précoce et atteint un niveau terminal sévère ; elle peut s'expliquer par une destruction accrue des lymphocytes circulants, par une lymphopoïèse diminuée, ou par la conjonction des deux. Une atteinte directe des lymphoblastes précurseurs est très envisageable (voir histologie).

La neutropénie est moins nette, probablement moins précoce et par ailleurs altérée par la tendance à la neutrophilie qu'induit la cystite à j 9 - j 11. Elle peut s'expliquer par une destruction accrue dans la circulation, une sortie accrue des granulocytes du secteur sanguin sans compensation ; ou par une réduction de l'activité médullaire myéloïde. Cette dernière éventualité est étayée par l'apparition de nombreux neutrophiles jeunes à j 11 (30 %) et à j 14 (42 %) qui évoque une neutropénie dégénérative. Ceci est une constatation souvent faite en pathologie digestive équine et expliquée par la toxémie associée à ces cas ; cela peut aussi témoigner d'une atteinte centrale de la lignée myéloïde (voir histologie), par l'extrait toxique lui-même.

Enfin, l'atteinte conjointe lymphoïde et myéloïde sans modification immédiate de la lignée rouge doit conduire à envisager une activité radiomimétique de l'extrait sur la moelle osseuse hématopoïétique. Il est regrettable à cet effet que la thrombocytemie n'ait pas été suivie durant l'expérience, mais une numération rétrospective par la méthode indirecte fournit des résultats qui vont à l'appui de cette thèse.

## VI - SYNTHESE CLINIQUE

L'ensemble des paramètres étudiés permet donc de mettre en évidence des atteintes multiples :

- hépatique,
- sanguine,
- digestive,
- nerveuse,
- musculaire ou myocardique,
- rénale.

La perturbation des fonctions hépatiques est la première perçue, par biochimie sanguine dès j 7, par biochimie urinaire et cliniquement à j 11.

Les perturbations hématologiques sont de deux ordres :

- leucopénie avec lymphopénie et neutropénie dès j 7 - j 9 et thrombocytopénie ;
- déshydratation dès j 9, qui n'est pas perçue à l'examen physique.

L'atteinte digestive est reconnue cliniquement à j 13 (petite diarrhée) ; elle explique l'aggravation de la déshydratation et peut être en relation avec l'atteinte hépatique. L'arrêt de consommation alimentaire coïncide avec ces signes digestifs.

Les premiers signes de déficit nerveux sont également notés à j 13 ; ils s'accroissent à j 14 sans atteindre un niveau préoccupant.

C'est en phase terminale que l'on envisage une atteinte musculaire ou myocardique, par biochimie sanguine ; l'auscultation cardiaque ne révèle alors aucune anomalie autre que la tachycardie.

L'atteinte rénale est également terminale ; elle peut être un facteur aggravant de la déshydratation et entrer dans les causes des troubles circulatoires (tachycardie, congestion périphérique).

On constate donc une atteinte successive de toutes les fonctions essentielles, sans que des liens de cause à effet puissent être dressés entre tous les troubles observés.

L'étude clinique est surtout dominée par l'apparition tardive de signes préoccupants ; la leucoencéphalomalacie (LEM) serait donc un accident extrêmement brutal consécutif à une lente accumulation du (des) principe(s) toxique(s).

T A B L E A U      X V

	j -32	j -7	j 0	j 1	j 2	j 3	j 4	j 5	j 6	j 7	j 8	j 9	j 10	j 11	j 12	j 13	j 14	j 15	
Poids vif	320 kg	348 kg	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	300 kg estimés	
Examen à distance	debout et calme attentive																debout et calme attentive	faiblesse apathie	morte rigidité cadavé- rique.
Température rectale	36°4	36°6	36°4	36°4	36°5	36°4	37°2	37°6	36°8	36°3	37°1	38°	37°4	37°1	37°5		37°5	-	
Muqueuses	jaune léger						jaune accentué	jaune léger						jaune accentué	jaune ± marqué		jaunes et conges- tionnées	jaunes et pâles	
Appareil respiratoire	stabilité de la fonction respiratoire durant toute l'expérience																	-	
Poul (fréquence)	-	-	32	32	36	38	38	44	40	36	40	36	40	36	36		52		
Coeur : fréquence	34	36	34	32	37	36	42	45	38	36	42	37	42	36	36		54		
rythme	régulier	rég.	rég.	rég.	rég.	rég.	rég.	rég.	rég.	rég.	rég.	rég.	rég.	rég.	rég.		régulier	-	
auscultation								renfor- cement du 2° bruit											
Appareil digestif	normal							diarrhée modérée bruits caecaux	normal								diarrhée modérée	traces de diarrhée	
Appareils génital et urinaire					sondage urinaire R.A.S.		sondage urinaire R.A.S.			sondage urinaire R.A.S.		sondage urine foncée		sondage urine foncée			sondage urine jau- ne-brun et trouble	-	
Locomotion	normal							tendance à traîner les posté- rieurs	curetage du sabot post. D	normal						tendance à traîner les posté- rieurs	répugne au déplace- ment, petite spasticité des quatre membres	-	
Fonctions nerveuses																		-	
Dose d'intoxication (poids équivalent)	0	0	maïs 1.500 g	maïs 1.500 g	maïs 1.500 g	maïs 1.500 g	maïs 1.000 g	maïs 1.000 g	riz 750 g	maïs 750 g	maïs 750 g	maïs 750 g	maïs 750 g	maïs 750 g	maïs 750 g	maïs 750 g	maïs 750 g	-	

**T A B L E A U    X V I**

Normes		Unité/l	j -7	j 1	j 4	j 7	j 9	j 11	j 14	j 15
2-6	Urée	mmol	7,3	5,6	7,0	6,4	6,8	5,2	19,8	morte
140-200	Créatinine	μ mol	110,4	81,7	86,3	146,1	155,6	125	394	
50-100	Protéines totales	g	80,3	80,6	79,3	86,5	85,7	89,6	93,5	
100-300	AST (SGOT)	UI	237	181					1847	
1-100	ALT (SGPT)	UI	10,8	3,7	13		7,2	9,7	21	
30-200	ALP (Phos. al.)	UI	155	191	164,9	227,9	207,4	250	432	
5-60	GT (GGT)	UI	7	9,2	7,4	12,2	18,1	33,3	60,8	
40-200	CPK	UI								
10-80	Bilirubine totale	μ mol	16,5	39,6	18,75	50,2	54,6	66	177	
9-73	Bilirubine libre	μ mol	10,34	34,8	8,15	42,7	37,6	50,6	154,2	
1-7	Bilirubine conj.	mol	6,6	4,76	10,6	7,5	17	15,4	22,8	
18-40	Albumine	g/l	31,6	32,9	34,7	33,5	33,7	34		
0,6-1,6	Phosphore	mmol	1,4	0,95	0,65	0,80	0,98	1	3,5	
2,8-3,4	Calcium	mmol	2,7	2,9	2,8	2,7	2,8	2,7	2,7	
13-108	Ammoniaque	μg/dl	échec	22	non fait	non fait	9	31	98	
3,3 <sup>±</sup> 4,2	OCT	UI/l	1,2	0,9	3,25	24,6	13,6	19,5		
< 1	SDH	UI/l		0,3	non fait	1,8	3,2	3,8	0,3	
8-11	Temps de Quick	Secondes	13	non fait	12	14	16,5	11	13	

**Electrophorèse des protéines sériques**

37-44	Albumines	%	44,9	43	40,7	43,4	43,2	39,4	45,3	
56-63	Globulines totales	%	54,8	56,9	59,2	56,5	56,7	60,5	54,5	
4-5	α 1	%	2,4	1,5	3	4,5	3,5	5,5	2,7	
9-12	α 2	%	11	14,2	12,3	13	14,7	14,5	16	
18-22	β	%	18,5	17	21,4	17,5	16,1	19,9	13,9	
21-29	γ	%	22,9	24,2	22,5	21,5	22,4	20,6	21,9	

TABLEAU XVII

Normes		j - 7	j 1	j 4	j 7	j 9	j 11	j 14	j 15
7-10	$\times 10^3/\text{mm}^3$ GLOBULES BLANCS	8,4	6,2	7,2	5,7	5,4	6,7	4,4	-
6-9	$\times 10^6/\text{mm}^3$ GLOBULES ROUGES	8,76	7,59	8,01	9,02	7,60	9,16	11,56	-
11-18	g/100 ml HEMOGLOBINE	16,0	13,5	15,0	16,2	17,5	16,4	20,2	-
32-52	% HEMATOCRITE	43,6	35,4	37,1	41,1	41,0	47,1	57,0	-
34-58	$\mu^3$ VOLUME MOYEN CEL.	48	47	47	46	-	52	49	-
12-18	$\mu\mu\text{g}$ TAUX GLOBULAIRE MOYEN Hb	17,7	17,8	18,8	18,1	-	17,6	17,1	-
31-37	g/100m CONCENTRATION GLOB Hb	37,2	38,1	40,1	39,3	-	34,0	34,5	-
90-250	$\times 10^3/\text{mm}^3$ PLAQUETTES	72,07	—	32,4	—	19,44	11,25	3,96	-
<b>Formule leucocytaire relative</b>									
35-70	NEUTRO.	67	67	66	70	74	83	80	-
0-3	EOSINO.	5	7	5	3	2	2	0	-
0-1	BASO.	1	1	3	1	1	3	0	-
25-70	LYMPHO.	24	19	22	24	20	11	15	-
0-4	MONO.	3	6	4	2	3	1	5	-
<b>Formule leucocytaire absolue</b>									
	NEUTRO.	5.628	4.154	4.752	3.990	3.996	5.561	3.520	-
	EOSINO.	420	434	360	171	108	134	0	-
	BASO.	84	62	216	57	54	201	0	-
	LYMPHO.	2.016	1.178	1.584	1.368	1.080	737	660	-
	MONO.	252	372	288	114	162	67	220	-



# COMPTE - RENDU D'AUTOPSIE

(Jument n° 1)

13 août 1986

## Date de la mort

- \* animal . vu debout le 11 août 1986 à 16 h 00.  
  . trouvé mort le 12 août 1986 à 8 h 30.
- \* mort estimée à 4 - 5 heures du matin.
- \* autopsie débutant à 9 h 30.

## Examen externe

- \* l'animal est en décubitus latéral droit, mais le côté gauche est également souillé de boue ; rigidité cadavérique ; aucune trace de débattement ;
- \* les muqueuses oculaires sont jaunes et pâles ;
- \* le recul des yeux signe une forte déshydratation ;
- \* écoulement de sang par les naseaux lors de la suspension de la carcasse.

## Examen sous-cutané

Normal sur peau thoracique, abdominale et céphalique.  
Muscles de couleur normale.

## Autopsie du système nerveux

Congestion des méninges cérébrales et cérébelleuses.

cerveau : une petite zone de ramollissement très probable en région crâniale inférieure de l'hémisphère droit ; altération lors du prélèvement à gauche ;

cervelet : abîmé lors de l'ouverture crânienne ; aspect normal ;

moelle épinière : examen de C1 - Th2 - Th12 : normal.

## Organes génitaux et urinaires

rein gauche : décapsulation facile ;  
  décoloration du cortex, semblant friable ;  
  médullaire externe congestionnée ;  
  quelques gouttes de liquide opalescent au niveau des crêtes pyéliquies.

rein droit : décapsulation moins facile ;  
  cortex friable ;  
  même aspect modifié par l'hypostase.

surrénale gauche : hémorragie de la corticale. droite : idem.

uretères : normales.

vessie : vide ; présence de pus ;  
muqueuse congestivo-hémorragique ;  
urèthre : idem dans son premier segment ;  
utérus : muqueuse d'aspect congestif ;  
ovaires : kyste sur ovaire droit ;

### Appareil digestif

langue et cavité buccale :  
oesophage : RAS  
pharynx :  
estomac : tympanisé ; plein ;  
muqueuse antrale congestionnée ;  
absence de gastrophiles ;  
duodénum : normal ;  
jéjunum : congestion de la muqueuse ;  
ramolissement du contenu ;  
iléon : idem ;  
caecum : congestion et hémorragies en flaqes sur toute la muqueuse ;  
quelques trichonèmes (larves) dans la paroi de la pointe caecale ;  
colon : I : diarrhée ; muqueuse congestivo hémorragique ;  
II : diarrhée ;  
III et IV : diarrhée ; congestion de la muqueuse ;  
flottant : diarrhée ; congestion ;  
rectum : diarrhée ;  
ganglion mésentérique : couleur sombre.  
pancréas : hémorragique ;  
foie : congestion de tout l'organe exagérée à droite par l'hypostase ;  
décoloration diffuse du parenchyme avec ponctuation rouge sombre  
centrolobulaire ;  
périhépatite villeuse modérée.

### Appareil circulatoire

rate : normale, exsangue.  
jugulaire gauche : hématome périveineux (prises de sang).  
coeur : forte dilatation du coeur droit, avec paroi mince et cavité élargie ;  
décoloration de tout le myocarde ;  
péricarde, endocarde, valvules : RAS.  
absence de caillots : sang incoagulable.  
sang : incoagulable et hémolysé dans toutes les régions du cadavre.

### Appareil respiratoire

cavités nasales :  
larynx, trachée : RAS.

poumon droit : hypostase ;  
hémorragie dans tout l'organe, accentuée dans le lobe apical.  
poumon gauche : hémorragie du lobe apical ; lobe postérieur non affaissé  
avec zones d'emphysème.

### Autopsie particulière de l'encéphale

Après 6 heures de préfixation dans le formol le bloc cérébro-cérébelleux est divisé par 3 sections transversales :

- . en avant du chiasma optique,
- . à moitié du cerveau,
- . en avant des tubercules quadrijumeaux.

Après 48 heures de fixation, tout l'encéphale est découpé en tranches transversales de 1 cm d'épaisseur environ numérotées à partir de l'avant et disposées en ordre dans le formol.

Ceci permet de mettre en évidence une zone de destruction de la substance blanche en région crâniale de l'hémisphère cérébral droit :

- la perte de substance s'étend en profondeur sur 2 à 3 centimètres ;
- elle est surmontée par un cortex cérébral macroscopiquement intact qui marque nettement les limites de la lésion.

Une lésion équivalente est notée dans l'hémisphère cérébral gauche, en région temporale basse.

Par ailleurs, il est constaté en surface des méninges plusieurs zones de 1 à 2 cm de diamètre, de consistance gélatineuse et de couleur jaune franche, accentuée par la fixation.

Un ramollissement de la corne d'Ammon gauche est suspecté.

### Bilan

Des lésions macroscopiques nombreuses sont constatées sur tous les appareils :

- lésions anciennes : dilatation cardiaque droite,  
périhépatite villeuse,  
trichonémose caecale,  
kyste ovarien.
- lésions très récentes : congestion méningée et zones très probables de ramollissement cérébral,  
atteinte rénale et hépatique,  
cystite,  
congestion de tous les segments digestifs et  
diarrhée sévère,  
dégénérescence du myocarde.
- lésions agoniques : hémorragie pulmonaire.

On peut regrouper les lésions selon leur nature :

- . lésions congestives ou hémorragiques :
  - méninges, :
  - reins et foie, : congestion
  - utérus, :
  - tous segments digestifs, :
  - surrénales et pancréas, :
  - poumons. : hémorragies

. lésions dégénératives :

parenchyme rénal,  
parenchyme hépatique,  
myocarde.

Conclusion

La mort de l'animal est expliquée par les atteintes rénale, hépatique et cardiaque ; l'atteinte digestive explique la déshydratation et laisse supposer des perturbations hydro-électrolytiques graves ; un syndrome hémorragique terminal est très probable, tandis que la cystite n'est pas tenue pour fatale.

Les lésions macroscopiques de l'encéphale, des reins, du foie et, à un degré moindre la congestion du tractus digestif, rendent l'hypothèse de L.E.M. quasi certaine. La lésion cérébrale mérite plus que toute autre une confirmation histologique ; cependant l'atteinte dégénérative cardiaque, hépatique et rénale permet d'affirmer dès l'autopsie une activité toxique certaine chez le cheval de l'extrait aqueux utilisé.

Toutes ces lésions macroscopiques sont en accord avec les conclusions de l'examen clinique à j 14.

Commentaire

Parmi ces lésions dégénératives :

- l'atteinte cardiaque (myocarde) n'est rapportée par aucun auteur traitant de L.E.M. équine ;
- l'atteinte hépatique diffuse, sans fibrose (et donc récente), semble toxique plutôt que liée à la seule insuffisance cardiaque droite ; on peut cependant envisager une aggravation de l'atteinte hépatique par les troubles de la fonction cardiaque, lesquels sont apparus tardivement.

(Jument n° 1)

## Système nerveux

### 1 - Cerveau

Le cerveau est marqué par deux zones étendues de nécrose colliquative (régions crâniale et occipitale de l'hémisphère gauche), affectant la substance-blanche infra-corticale. Ces zones sont mal délimitées en profondeur où la substance blanche montre une forte "spongieuse" imputable également au processus de nécrose ; à distance, la substance blanche est oedématiée, l'oedème se manifestant par des grands espaces périneuronaux et périvasculaires, optiquement vides ou parfois remplis d'un liquide hyalin, faiblement éosinophile. Ces collections d'oedème tendent à refouler le tissu nerveux environnant.

La substance grise cérébrale, macroscopiquement intègre, montre également à l'examen microscopique des figures d'oedème, surtout périvasculaire et de nécrose neuronale : nombreux corps cellulaires sont condensés, hyperbasophiles, avec des noyaux picnotiques ou parfois en caryolyse.

La corne d'Amon gauche, qui montrait en macroscopie un aspect de ramollissement, est également marquée histologiquement par un oedème important et la présence de nombreux neurones nécrosés ; les hémorragies périvasculaires sont nombreuses, étendues et accompagnées de quelques infiltrats lympho-plasmocytaires.

En dehors des zones macroscopiquement lésées, le tissu cérébral est également modifié. L'aspect "vaccuolaire" de la substance blanche attribué à l'oedème est retrouvé en de nombreuses régions et doit donc être considéré comme diffus.

L'étude des vaisseaux, dans toutes les régions du cerveau, permet d'envisager une atteinte vasculaire également diffuse, qui prend plusieurs aspects :

- effractions des parois capillaires ;
- hémorragies périvasculaires envahissant les espaces de Virchow-Robin et s'étendant parfois dans la substance nerveuse environnante ;
- nombreux manchons périvasculaires, toujours petits, de nature lymphocytaire ou lympho-plasmocytaire ; quelques polynucléaires éosinophiles sont parfois présents ;
- petits amas périvasculaires peu nombreux de macrophages pigmentés, bruns, correspondant probablement à une surcharge hémossidérinique (étude spéciale en cours).

De façon plus sporadique, on trouve quelques vaisseaux à endothélium turgescents et marqués par un oedème de la média artériolaire. L'une de ces artérioles montre en outre une média très basophile, pouvant correspondre à une imprégnation calcique (étude spéciale en cours).

### 2 - Cervelet

La substance blanche cérébelleuse est également infiltrée par un oedème important, tout particulièrement dans le lobe droit ; l'oedème du cortex cérébelleux est par contre plus diffus et dissocie la couche granuleuse.

### 3 - Bulbe rachidien

L'oedème de la substance blanche y est notable ; il n'y a pas d'autre altération morphologique.

### 4 - Moelle épinière

On retrouve dans le tissu nerveux médullaire les mêmes lésions que dans l'encéphale ; elles sont associées ou non selon les segments :

- au niveau de C1 seuls sont notés quelques petits infiltrats périvasculaires constitués de lymphocytes ;
- au niveau de Th2 ils sont également présents, ainsi qu'une hémorragie dans la substance grise ; la substance blanche semble modérément oedématisée ;
- au niveau de Th12 on note plusieurs hémorragies périvasculaires.

### 5 - Méninges

Les méninges de tous les centres nerveux sont congestionnées ; les hémorragies sont également nombreuses dans l'arachnoïde.

## Organes génitaux et urinaires

### 1 - Reins

Les reins sont marqués par des altérations morphologiques symétriques.

La médullaire est très congestionnée, surtout dans sa zone externe et des altérations vasculaires y sont notables :

- quelques hémorragies périvasculaires ;
- une hémorragie intrapariétale dans une grosse artériole ;
- plusieurs vaisseaux montrent un endothélium clivé de la média par un liquide abondant, limpide et peu colorable tenu pour du liquide d'oedème.

Les tubules montrent des aspects d'autolyse sous la forme de cellules épithéliales hyper colorables, à noyau rond central et de lambeaux épithéliaux desquamants ; cependant nombreux sont affectés d'une réelle nécrose. En outre, certains tubules de la médullaire profonde renferment des formations amorphes très éosinophiles.

Dans le cortex, les glomérules semblent épargnés, mais une petite fibrose les entoure systématiquement ; elle est attribuée à l'âge de l'animal.

L'atteinte portant sur les tubes contournés proximaux est beaucoup plus évidente : de façon diffuse, les cellules de ces tubules sont altérées, essentiellement au niveau des bordures en brosse qui sont désorganisées ; on note aussi de nombreuses cellules vacuolisées, avec un noyau condensé, qui sont tenues, pour un stade morphologique antérieur de la même atteinte.

Aucune réaction inflammatoire n'est observée, ni dans le cortex, ni dans la médulla ; par contre, l'interstitium est ponctué uniformément de très nombreux précipités bruns (recherche de leur nature en cours).

### 2 - Vessie

L'épithélium transitionnel est marqué par une forte desquamation imputable, au moins en partie, à l'autolyse ; en outre il surmonte un chorion congestionné, ponctué de petites hémorragies et infiltré de lymphocytes et de granulocytes. Ces cellules sont retrouvées en petit nombre dans la lumière vésicale.

Ces lésions viennent confirmer le diagnostic clinique de cystite.

### 3 - Utérus

Muqueuse très peu développée ; les rares glandes sont au repos. Le chorion est modérément congestionné et infiltré par quelques lymphocytes. Il s'agit d'une image d'anoestrus.

### 4 - Surrénales

Les glandes surrénales sont symétriquement lésées ; il s'agit de congestion majeure et d'hémorragies s'étendant en nappe dans le cortex ; les structures endocrines conservent une morphologie normale.

## Appareil digestif

### 1 - Estomac

\* portion malpighienne : absence de lésion.

\* portion glandulaire : la muqueuse est altérée en surface par l'autolyse ; une exulcération est visible. Plus profondément, le chorion est très congestionné et certains vaisseaux sont tapissés par des cellules endothéliales turgescentes, évoquant un oedème ; deux d'entre eux sont également entourés de quelques lymphocytes.

### 2 - Duodénum

L'autolyse est très marquée, affectant toutes les villosités et une grande partie des glandes de Lieberkühn ; les glandes de Brünner sont par contre bien conservées, de même que la sous-muqueuse et les couches musculaires.

### 3 - Jéjunum

La muqueuse montre les mêmes altérations autolytiques, tandis que le chorion et la sous-muqueuse sont congestionnés et envahis de cellules éosinophiles, nombreuses, grosses, à noyaux sombres et irréguliers ; ces cellules semblent être des macrophages. D'autres histiocytes nombreux sont pigmentés ; la nature de cette pigmentation est à l'étude.

### 4 - Iléon

Les mêmes altérations autolytiques et lésionnelles sont constatées, auxquelles s'ajoute un oedème modéré de la sous-muqueuse.

### 5 - Caecum

La muqueuse est fortement autolysée ; son chorion est envahi par de nombreux lymphocytes et plasmocytes, ainsi que par des cellules éosinophiles du même type que celles observées au niveau jéjunal.

La sous-muqueuse présente les mêmes altérations ; elle est en outre congestionnée et envahie par de nombreux bacilles dans sa portion interne. Certains de ses vaisseaux semblent lésés : l'un montre un thrombus récent ; d'autres semblent présenter un endothélium prolifératif, sur lequel sont tapis d'assez nombreux leucocytes. On note aussi quelques petites hémorragies sous endothéliales et d'assez nombreux précipités bruns périvasculaires.

Au niveau de la pointe caecale, la musculature externe montre une fibrose diffuse et deux granulomes typiques sont observés ; ces lésions sont attribuées à des larves de Trichonèmes.

## 6 - Colon

Dans ses différentes portions, le colon est affecté des mêmes lésions que celles constatées aux niveaux jujuno-iléal et caecal.

## 7 - Pancréas

Cet organe est fortement nécrosé, de sorte qu'il est peu reconnaissable ; cependant, la lobulation est conservée et l'organe est parcouru de vastes et nombreuses hémorragies interlobulaires qui se collectent dans quelques lobules nécrosés. On y constate de nombreux précipités bruns tenus pour de l'hémosidérine, ainsi que de nombreux et grands bacilles, très allongés, groupés en chaînettes.

## 8 - Foie

Tout l'organe présente les mêmes altérations ; la lobulation est conservée, régulière et l'on note une petite fibrose autour des veines centrolobulaires qui peut être attribuée à l'âge de l'animal.

Mais surtout, tous les lobules montrent une nécrose de liquéfaction majeure, centrolobulaire, où de nombreux bacilles sont présents. Seule une petite couronne de parenchyme périphérique persiste pour chaque lobule, où les sinusoides sont distendus par la stase sanguine. On y note de nombreux précipités bruns tenus pour être des macrophages hémosidériniques (recherche en cours).

Des lymphocytes et des neutrophiles sont présents dans les sinusoides et les foyers de nécrose.

Dans les portions droites du foie, la congestion est accentuée par l'hypostase et de petites hémorragies sont visibles dans les espaces portes.

## Appareil circulatoire et organes hématopoïétiques

### 1 - Coeur

\* ventricule gauche : les fibres myocardiques conservent le plus souvent une morphologie normale : leurs noyaux sont centraux, parfois doubles et la double striation est visible. Entre les fibres par contre, on trouve des espaces clairs qui pourraient correspondre à la nécrose de certaines d'entre elles ou à de l'oedème.

\* ventricule droit : le myocarde est altéré : de nombreuses fibres sont hyper-colorables, à noyaux condensés et irréguliers, ces images évoquant la nécrose. De plus, les espaces clairs entre les fibres sont nombreux.

Dans le conjonctif sous endocardique et entre les fibres musculaires, de nombreux bacilles sont présents.

\* septum interventriculaire : la coupe transversale montre de nombreuses fibres hyper-colorables, d'aspect hyalin, ou de couleur normale et vacuolisées en leur centre. Ces figures sont tenues pour des aspects de nécrose.

En coupe longitudinale, les espaces clairs entre les fibres sont nombreux ; quelques bacilles sont visibles.

### 2 - Rate

La pulpe blanche montre une atteinte régressive majeure : les follicules sont absents et les gaines périartériolaires quasi-inexistantes. Les cellules de la pulpe sont surtout de type histiocytaire, à cytoplasme développé et noyau peu régulier. D'autre part, les macrophages pigmentés par l'hémosidérine sont nombreux.



### 3 - Moelle osseuse

L'examen pratiqué sur la 2ème vertèbre thoracique révèle une moelle très adipocytaire où les macrophages à hémossidérine sont nombreux.

La fonction hématopoïétique paraît globalement conservée mais elle est surtout érythropoïétique. La lignée myéloïde semble appauvrie, tandis que les mégacaryocytes, bien représentés, montrent pour la plupart des altérations nucléaires.

### Appareil respiratoire

\* poumon droit : organe massivement hémorragique, évoquant une lésion d'infarctus ; le flux de sang s'étend jusque dans les bronches. On note également la présence de nombreux bacilles et de nombreux précipités bruns, disséminés (étude de leur nature en cours).

\* poumon gauche : même atteinte hémorragique.

### Bilan

Les lésions microscopiques constatées sont multiples et s'accordent avec les observations macroscopiques de l'autopsie.

De façon analytique, on peut dire que des lésions graves, pouvant expliquer la mort, siègent sur l'ensemble des centres nerveux, sur les reins, les surrénales, le pancréas, le foie et tout le secteur digestif ; les hémorragies pulmonaires, quant à elles, et vu leur étendue, sont assurément synchrones et responsables de la mort de cette jument.

Les lésions myocardiques, certainement patentes, sont écartées de la discussion car très difficiles à appréhender par les moyens de l'histologie classique.

Les constatations microscopiques faites sur l'ensemble des organes permettent de reconnaître cinq grands groupes lésionnels :

- 1 - un syndrome hémorragique, affectant le système nerveux, les reins, les glandes surrénales, le pancréas, certains segments digestifs et les poumons ;
- 2 - une prolifération bacillaire dans le secteur digestif, le pancréas, le foie, le cœur droit et les poumons, exempte de réponse inflammatoire ;
- 3 - une atteinte majeure des centres nerveux sous la forme d'œdème, d'hémorragies et de nécrose ;
- 4 - une atteinte dégénérative diffuse et grave des reins et du foie, organes impliqués dans tout processus toxique ;
- 5 - une régression lymphoïde notable dans la rate et les plaques de Peyer, accompagnée d'une probable hypoplasie médullaire lymphoïde et myéloïde.

1 - **Le syndrome hémorragique** est à mettre en relation avec la thrombocytopénie constatée cliniquement ; il doit aussi être rapproché des lésions purement vasculaires constatées sur différents organes (centres nerveux, reins, estomac et caecum) et probablement présentes sur d'autres sans pouvoir y être mises en évidence. Ceci évoque fortement une toxicité propre des extraits de Fusarium moniliforme (souche 68 R) sur la paroi des vaisseaux, telle que divers auteurs l'ont déjà envisagée. L'atteinte nerveuse centrale est alors reconnue comme une conséquence particulière de ces lésions vasculaires.

**2 - La prolifération bacillaire**, sans réaction inflammatoire doit être tenue pour un événement postérieur, ou immédiatement antérieur à la mort. Cette seconde éventualité est étayée par la topographie de la répartition bacillaire, qui permet d'envisager une septicémie à partir du secteur digestif, suivie d'une prolifération bactérienne post-mortem. Cette septicémie, incomplète, a probablement joué un rôle dans la mort de l'animal. Elle ne semble pas cependant pouvoir expliquer les lésions observées, même dans le cas de toxiinfection et est tenue pour une pathologie consécutive ou concomittente. Elle est à mettre en relation avec la déficience immunitaire constatée par ailleurs.

**3 - L'atteinte nerveuse centrale** est tout à fait conforme aux lésions décrites dans les cas de L.E.M. équine ; on peut donc affirmer que la souche 68 R de Fusarium moniliforme est capable d'induire cette pathologie. Les lésions macroscopiques de ramollissement cérébral étaient déjà très évocatrices ; l'histologie en apporte une confirmation, par l'observation d'oedèmes cérébral, cérébelleux et spinal, de pertes de substance cérébrale, de nécrose neuronale, de microhémorragies périvasculaires et parfois plus diffuses, de macrophages pigmentés et de manchons lymphoplasmocytaires périvasculaires. Ces derniers sont ici peu développés, ce qui est mis au compte d'une mort très précoce dans le déroulement de l'affection. Cette atteinte nerveuse centrale apparaît donc bien devoir être tenue pour une conséquence des lésions vasculaires primitives : certaines figures de nécrose neuronale évoquent une ischémie brutale ; les lésions vasculaires sont nombreuses dans les centres nerveux : brèches vasculaires ; oedème intimal ; dissociation des médias artériolaires par de l'oedème ou des microhémorragies intrapariétales ; une artériole thrombosée ; une autre à paroi hyperbasophile.

De plus, parmi les lésions extra-nerveuses constatées ici, certaines sont fréquemment rapportées dans les cas de L.E.M. :

- atteinte digestive,
- atteinte hépatique,
- hémorragies des cortex surrénaliens.

**4 - Les atteintes hépatique et rénales**, de type nécrose, sont très évocatrices d'une pathologie toxique, sans préjuger de sa nature. Elles ont été constatées chez le rat avec les mêmes extraits. L'atteinte hépatique que nous observons ici est systématiquement rapportée dans les cas de L.E.M., parfois même en l'absence de lésions nerveuses associées. Elles sont généralement décrites sous forme de fibrose centrolobulaire, qui sous-entend une intoxication chronique ; la nécrose que nous observons dans ce cas nous paraît pouvoir être prise pour la forme aiguë d'une intoxication de même type.

**5 - La régression lymphoïde** enfin, et probablement myéloïde à un degré moindre, n'est par contre pas décrite dans la L.E.M. Cependant, certains auteurs ont mentionné la production par Fusarium moniliforme de substances radiomimétiques, telles la moniliformine. Cette substance, recherchée par chromatographie en couche mince, n'a pas été mise en évidence dans notre extrait. Rappelons cependant que nous avons observé chez le rat de 20 jours des atrophies thymiques et spéniques avec régression lymphoïde, induites par les mêmes extraits.

## CONCLUSION

Au plan phytopathologique, les recherches d'une variété résistante ou tolérante se poursuivent. La connaissance plus précise de la physiologie de l'infection permettra de tester d'une manière non aléatoire d'éventuels hybrides ou variétés sélectionnés au champ.

Au plan chimique et toxicologique, nous avons établi que le test sur canetons ne peut pas être considéré comme fiable car trop dépendant de l'équilibre de la ration alimentaire.

La reproduction de la L.E.M. par un extrait aqueux d'une souche toxique sur rats, montre que la ou les toxines sont hydrosolubles et que le rat est un bon indicateur de la toxicité pour l'extrait total.

Mais les tests, sur les rats et les cellules VERO, très contradictoires pour certaines fractions, exigent de notre part un effort supplémentaire destiné à donner aux chimistes les moyens de poursuivre plus avant leurs études pour isoler et identifier la (ou les) principe(s) toxique(s).

## BIBLIOGRAPHIE

ANGELIER (N), BOUTEILLE (M.) et al - 1976 - Detection of Nucleic Acids by means of ultrastructural autoradiography - J. Microscopie Bio. Cell., 27 : 215 - 230.

BETINA (V) - 1984 - Mycotoxins - Production, isolation, separation and purification - Ed ELSEVIER, 528pp.

BERNIER (G), BRONCHART (R.) - 1963 - Application de la technique d'historadiographie à l'étude de l'incorporation de Thymidine tritiée dans les méristèmes caulinaire - Bull. Soc. Royale Sciences Liège, 32 (3-4) : 269-283.

BOOTH (C.) - 1971 - The genus Fusarium - CMI - 237p.

BURMEISTER (H.R.) et al - 1979 - Moniliformin, a metabolite of Fusarium moniliforme NRRL 6322 : Purification and toxicity. Appl. Environ. Microbiol., 37 (1): 11 - 13.

CALAS (A). - 1978 - La radiographie et ses applications en biologie - Rapport CNRS - 7pp.

JEMMALI (M.) - 1977 - Les Mycotoxines dans l'alimentation - IIIème Symposium international I.U.P.A.C. sur les mycotoxines dans l'alimentation - Annales de la nutrition et de l'alimentation - édition C.N.R.S. : 403 - 1042.

KRIERK (N.P.J.) et al - 1981 - Hepato and cardiotoxicity of Fusarium verticillioides (F. moniliforme) isolates from southern african maize. Fd. Cosmet. Toxicol., 19 : 447 - 456.

KULIGOWSKI - ANDRES (J.), TOURTE (Y.) - 1978 - Première étude, par autoradiographie, de la fécondation chez une Ptéridophyte. Biol. Cellulaire, 31 (1) : 101 - 108.

KURATA (H.), UENO (Y.) - 1984 - Toxicogenic Fungi - Their toxins and health hazard. Proceedings of the Mycotoxin symposia - Third International Mycological Congress, Tokyo, 1983 - Ed. ELSEVIER, 363pp.

MARASAS (W.F.O.) et al. - 1978 - Mycotoxicological investigation on Zambian maize. *Fd. Cosmet. Toxicol.*, 16 : 39 - 45.

MARASAS (W.F.O.) et al - 1979 - Incidence, geographic distribution and toxigenicity of Fusarium species in South African corn. *Postharvest Pathology and Mycotoxins*, 69 (11) : 1181 - 1185.

MARASAS (W.F.O.) et al. - 1984 - Toxigenic Fusarium species - Identity and Mycotoxicology - The Pennsylvania State University Press. University Park and London, 328pp.

NELSON (P.E.) et al - 1981 - Fusarium, Diseases, Biology and Taxonomy - The Pennsylvania State University Press, University Park and London, 457pp.

PELLEGRIN (F.) et al - 1986 - Potentiel toxigène des souches de F. moniliforme parasitant le maïs en Nouvelle-Calédonie, *Microbiologie, Aliment, Nutrition*, (à paraître).

RABIE (C.J.) et al - 1978 - Moniliformin, a mycotoxin from Fusarium fusarioïdes - *J. Agric. Food Chem.*, 26 (2) : 375 - 379.

SAMUELSSON (G.) et al - 1985 - Preliminary chemical characterization of pharmacologically active compounds in aqueous plant extracts - *Journal of Ethnopharmacology*, 14 : 193 - 201.

SHIMIZU (Y.) - 1985 - Bioactive marine natural products, with emphasis on handling of water-soluble compounds - *Journal of Natural Products*, 48 (2) : 223 - 235.

STEYN (M.) et al - 1978 - Isolation and purification of Moniliformin - *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, 61 (3) : 578-580.

STEYN (P.S.), VELGGAAR (R.) - 1986 - Mycotoxins and Phycotoxins - Collection of invited papers presented at the Sixth International I.U.P.A.C. Symposium on Mycotoxins and Phycotoxins - Ed. ELSEVIER, 545pp.